ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

ANNEE : 1982 THESE : 64

LE DIAGNOSTIC EXPERIMENTAL DES VIROSES RESPIRATOIRES DES BOVINS

THESE

Pour le Doctorat Vétérinaire
(Diplôme d'Etat)
Présentée et soutenue publiquement en 1982
devant l'Université Paul Sabatier de Toulouse

par

Eric COUTANCEAU

Né le 10 mars 1958 à POITIERS (VIENNE)

Membres du Jury

Président : ..... Monsieur CARLES
Professeur à l'Université Paul Sabatier de Toulouse

Assesseurs : ..... Monsieur BEZILLE
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Monsieur CHANTAL
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

UNIV.
LEIDEN
1881

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547622_0016

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

ANNEE : 1982 THESE : 64

LE DIAGNOSTIC EXPERIMENTAL DES VIROSES RESPIRATOIRES DES BOVINS

THESE

Pour le Doctorat Vétérinaire
(Diplôme d'Etat)
Présentée et soutenue publiquement en 1982
devant l'Université Paul Sabatier de Toulouse

par

Eric COUTANCEAU

Né le 10 mars 1958 à POITIERS (VIENNE)

Membres du Jury

Président : ..... Monsieur CARLES
Professeur à l'Université Paul Sabatier de Toulouse

Assesseurs : ..... Monsieur BEZILLE
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Monsieur CHANTAL
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

MINISTERE DE L'AGRICULTURE

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur : ..... M.LAUTIE
Directeur honoraire : ..... M. FLORIO
Professeurs honoraires : ..... M. BRIZARD
..... M. SAURAT

PERSONNEL ENSEIGNANT
CHAIRE DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE

Professeur titulaire ..... M. GODFRAIN
Professeur sans chaire ..... Mme BURGAT-SACAZE

Pharmacie et Toxicologie

CHAIRE DE PHYSIQUE ET CHIMIE BIOLOGIQUES ET MEDICALES

Professeur titulaire ..... M. RICO
Professeur sans chaire ..... M. BRAUN
Maître Assistant ..... M. BENARD

Physique Biologique et Médicale
Chimie Biologique et Médicale
Informatique biologique et médicale

CHAIRE D'ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES

Professeur titulaire ..... M. PAVAUX
Maître Assistant ..... M. LIGNEREUX
Maître Assistant ..... M. SAUTET

Organogénèse - Tératologie
Anatomie Générale - Anatomie Appliquée

CHAIRE DE PHYSIOLOGIE, PHARMACODYNAMIE ET THERAPEUTIQUE

Professeur titulaire ..... M. RUCKEBUSCH
Professeur sans chaire ..... M. FARGEAS
Maître Assistant Agrégé ..... M. TOUTAIN

Physiologie - Pharmacodynamie - Thérapeutique

CHAIRE D'HISTOLOGIE - ANATOMIE PATHOLOGIQUE

Professeur titulaire ..... M. VAN HAVERBEKE
Professeur sans chaire ..... M. CABANIE
Maître Assistant Agrégé ..... M. MAGNOL

Histologie - Embryologie
Anatomie Pathologique - Clinique

CHAIRE D'HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS D'ORIGINE ANIMALE

Professeur titulaire ..... M. LABIE
Maître de Conférences ..... M. EECKHOUTTE
Maître Assistant Agrégé ..... Mme BENARD

Hygiène - Inspection - Contrôle et Technologie des denrées alimentaires d'origine animale - Clinique

CHAIRE DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES

Professeur titulaire ..... M. DORCHIES
Maître de Conférences ..... M. FRANC
Maître Assistant ..... M. DUCOS DE LAHITTE

Zoologie appliquée - Ecologie - Parasitologie externe -
Dermatologie - Parasitologie interne - Clinique

CHAIRE DE SEMIOLOGIE ET PATHOLOGIE MEDICALE
DES EQUIDES ET CARNIVORES ET DE LEGISLATION

Professeur titulaire ..... M. LESCURE
Maître de Conférences ..... M. GUELFI
Maître Assistant ..... M. REGNIER

Sémiologie et Pathologie Médicale des Equidés et Carnivores
Législation Vétérinaire et Déontologie Clinique

CHAIRE DE PATHOLOGIE MEDICALE DU BETAIL
ET DES ANIMAUX DE BASSE-COUR

Professeur titulaire ..... M. TOURNUT
Maître de Conférences ..... M. BEZILLE
Maître Assistant ..... M. JOUGLAR

Sémiologie et Pathologie Médicale du bétail et des animaux de basse-cour
Clinique - Consultation itinérante

CHAIRE DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE

Professeur titulaire ..... M. CAZIEUX
Maître de Conférences ..... M. GENEVOIS
Maître-Assistant ..... M. AUTEFAGE
Maître-Assistant ..... M. FAYOLLE

Propédeutique et Sémiologie Chirurgicale - Radiologie - Technique Chirurgicale - Anesthésiologie
Pathologie Chirurgicale - Clinique - Traumatologie - Podologie orthopédique

CHAIRE DE PATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION

Professeur titulaire ..... M. FERNEY
Professeur sans chaire ..... M. ROYAL

Pathologie de l'appareil génital et de la mamelle - Sémiologie et Propédeutique - Pathologie de la Reproduction - Obstétrique et pathologie du nouveau-né - Clinique - Consultation itinérante

CHAIRE DE MALADIES CONTAGIEUSES - ZOONOSES -
LEGISLATION SANITAIRE

Professeur titulaire ..... M. CHANTAL
Maître Assistant ..... M. PICAVET

Epidémiologie - Maladies contagieuses - Zoonoses
Législation Sanitaire - Clinique

CHAIRE DE PATHOLOGIE GENERALE - MICROBIOLOGIE - IMMUNOLOGIE

Professeur titulaire ..... M. LAUTIE
Maître Assistant ..... M. PELLERIN
Maître Assistant ..... M. MILON

Microbiologie - Immunologie - Pathologie Générale

CHAIRE D'ELEVAGE ET ECONOMIE

Professeur titulaire ..... M. QUEINNEC
Professeur sans chaire ..... M. DARRE
Maître Assistant ..... Mme QUEINNEC

Ethnologie - Génétique animale - Extérieur - Zootechnie et Economie générales - Ethologie appliquée. Sciences. Techniques. Economie de l'Elevage et des Productionsanimales
Insémination artificielle - Organisation de l'Elevage

CHAIRE D'ALIMENTATION

Professeur titulaire ..... M. FALIU
Professeur sans chaire ..... M. GRIESS
Maître Assistant ..... M. ENJALBERT

Botanique appliquée et Bromatologie - Agronomie - Alimentation

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

MM. les Professeurs : ANGELIER, ARMENGAUD, COMBES, COMBRET, CROS, FERNET, et MAZENC.

La Faculté et l'Ecole déclarent n'être pas responsable des opinions émises par les candidats (Délibération de la Faculté en date du 10 mai 1891 et du Conseil de l'Ecole en date du 13 juin 1924).

A MA FEMME ET A MA FILLE

Qu'elles trouvent ici une preuve de mon amour.

A MES PARENTS

Reconnaissance et affection.

A MES BEAUX-PARENTS

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur CARLES

de l'Université Paul Sabatier de TOULOUSE

Qui a bien voulu nous faire l'honneur
de présider notre jury de thèse.

Hommage respectueux.

A NOTRE JURY DE THESE

Monsieur le Professeur BEZILLE
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Qui nous a guidé de ses conseils et nous a fait l'honneur de juger ce travail.

Qu'il trouve ici le témoignage de notre profonde reconnaissance.

Monsieur le Professeur CHANTAL
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Que nous remercions d'avoir bien voulu accepter de faire partie de notre Jury de thèse.

Hommage respectueux.

P L A N

INTRODUCTION : 2

PREMIERE PARTIE : LES B. P. I. E. ET LA VIROLOGIE.

- CHAPITRE I : Généralités sur les B. P. I. E.
  - A - Etiologie :..... 4-6
  - B - Symptômes et Lésions :..... 7-8
- CHAPITRE II : Virologie
  - A - R. T. I. :..... 9-11
  - B - B. V. D. :..... 12-14
  - C - PI_3 :..... 15-17
  - D - R. S. V. : 18-20
  - E - Adénovirus : 21-23
  - F - Réovirus :..... 24-25
  - G - Rhinovirus :..... 26-28

DEUXIEME PARTIE : LE DIAGNOSTIC EXPERIMENTAL.

- CHAPITRE I : Principes généraux du diagnostic
  - I . Diagnostic clinique :..... 30
  - II . Diagnostic étiologique :..... 30-31
- CHAPITRE II : Les prélèvements
  - I . Prise de sang :..... 32-35
  - II . Ecouvillonnage :..... 36-38
  - III . Organes :..... 39-40
  - IV . Commémoratifs :..... 40
- CHAPITRE III : Les différentes méthodes du diagnostic de laboratoire
  - A - Culture et E. C. P. :..... 43-50
  - B - Séroneutralisation :..... 51-59
  - C - Immunofluorescence :..... 60-69
  - D - Fixation du complément :..... 70-74
  - E - Hémagglutination passive :..... 75-78

F - Inhibition de l'hémagglutination :..... 78-8
G - Immunodiffusion :..... 83-8
H - C. I. E. O. P. :..... 88-8
(Contre-Immuno-Electro-Osmophorèse)
I - Méthodes Immunoenzymologiques :..... 90-9
J - Mise en évidence de l'immunité à médiation cellulaire :.... 95-9

CONCLUSION : INTERPRETATION DES RESULTATS SEROLOGIQUES :..... 98-9

BIBLIOGRAPHIE :..... 102-1

I N T R O D U C T I O N

Les maladies de l'appareil respiratoire se sont considérablement développées sur notre territoire, à la suite des transformations des modes d'élevage, notamment des jeunes bovins, plus particulièrement dans les installations d'élevage intensif destinées à la production de viande.

Il s'agit d'affections connues depuis longtemps et qualifiées de nombreux termes : "maladies des transports", "pasteurellose", "stress des veaux", "grippe bovine","rhinopneumonie", "bronchopneumonie virale", "pneumonie enzootique"..., il faut leur préférer la dénomination plus générale de "Bronchopneumopathies infectieuses enzootiques" (B. P. I. E.) (113).

Leur importance est illustrée par quelques chiffres (35). Dans la production du veau de boucherie, les affections respiratoires représentent en moyenne 30 % de la pathologie et sont responsables de morbidités ou pertes économiques dans des proportions atteignant parfois 10 à 20 % de l'effectif. Dans la production de jeune bovin, elles représentent 20 % de l'ensemble des troubles morbides et provoquent la perte de 2 à 3 % des sujets.

Des études menées en Grande-Bretagne ont montré que dans ce type de spéculation, le bénéfice pouvait être réduit de 2,0 à 7,0 % par an.

Il s'avère donc nécessaire de porter un diagnostic rapide et précis de ces affections multifactorielles où interviennent l'environnement, le terrain et les facteurs biologiques. Ce sont ces derniers qui nous interessent plus particulièrement dans cette étude.

L'objectif de ce travail est de fournir un précis de diagnostics virologiques et immunologiques des viroses respiratoires des bovins, qui s'adresse aux étudiants, aux praticiens et qui vise à assister l'homme de laboratoire.

P R E M I E R E P A R T I E

LES BRONCHOPNEUMOPATHIES INFECTIEUSES ENZOOTIQUES

ET LA VIROLOGIE

CHAPITRE I : GENERALITES SUR LES B. P. I. E.

A - ETIOLOGIE

Nous savons aujourd'hui que les B. P. I. E. sont des affections dont les facteurs étiologiques comprennent d'abord un élément d'agression (stress), et un élément infectieux lui-même composite et à évolution communément admise comme étant biphasique : "infection virale primaire, infection bactérienne secondaire".

I . CAUSES PREDISPOSANTES : L'ENVIRONNEMENT ET LE TERRAIN (16), (28), (77), (101), (103), (113)

1) Les facteurs climatiques :

Le froid et l'humidité provoquent une diminution de la résistance locale de l'épithélium respiratoire telles que dessication du mucus, paralysie de l'appareil muco-ciliaire...

2) La ventil ation incorrecte des locaux :

Insuffisante, elle augmente la pollution chimique et bactériologique de l'air ; excessive, elle provoque des refroidissements.

3) L'alimentation :

Interviennent principalement les déficiences ou déséquilibres en macro-éléments, oligo-éléments (Cu, Co, Fe, Mn , Zn..), en vitamines (A, E...) dont dépendent le fonctionnement des systèmes enzymatiques, l'équilibre neuro-hormonal..., en d'autres termes, le niveau de défense non spécifique de l'organisme.

4) Le transport d'animaux nombreux et le surpeuplement

Ils provoquent la mise en commun de multiples agents pathogènes.

5) Insuffisance des désinfections ou des vides sanitair

Qui entretient un microbisme important.

6) Parasitisme :

Il diminue la résistance générale et locale (Dictyocaules).

7) L'âge :

L'affection atteint essentiellement les jeunes (surtout de 4 jour à 2 mois), mais aussi les jeunes bovins (15 mois à 30 mois) et les adultes.

II . CAUSE DETERMINANTE : L'INFECTION (35), (77), (103)

Deux types d'agents jouent un rôle majeur dans les pneumopathies des bovins : les virus et les bactéries. Ils interviennent d'ailleurs dans cet ordre. Les virus seuls ou en association plus ou moins synergique, préparent l'implantation des bactéries par leur action au niveau de l'épithélium respiratoire.

1) Les bactéries :

De nombreuses bactéries ont été isolées, surtout Pasteurella (P. multocida, P. hemolytica), des colibacilles, des corynebactéries, Klebsiella, Bordetella, Salmonella...

On trouve les mycoplasmes chez le veau ; il s'agit de Myco-

plasma bovis, M. bovirhinis, M. arginini, Acholeplasma laidlauii...

2) Les virus :

a) Virus fréquents :

- Virus Para influenzae III (P I III)
- Adenovirus type I à IX (surtout type III)
- Réovirus

b) Virus moins fréquents :

- Herpèsvirus de la Rhinotrachéite infectieuse (RTI)
- Togavirus de la maladie des muqueuses (BVD)
- Rhinovirus
- Virus respiratoire syncytial (RSV)

Les virus, dont l'effet a été considéré jusqu'à présent comme transitoire et fugace, créant les premières lésions où s'installent les bactéries, sont en fait capables à eux seuls de provoquer des troubles et des lésions graves.

B - SYMPTOMES ET LESIONS

I . LES SYMPTOMES (23), (77), (103), (109)

Les symptômes des B. P. I. E. sont loin d'être aussi diversifiés que leurs agents étiologiques.

Dans une première phase, correspondant à l'intervention virale, se manifestent des signes généraux et respiratoires : fièvre avec jetage séreux, toux sèche et quinteuse, et polypnée.

A ce stade, la guérison peut survenir rapidement, sinon la maladie s'installe, entrant après 2 ou 3 jours d'évolution dans la phase secondaire.

Celle-ci correspond à l'intervention des bactéries ou à la poursuite de l'action virale.

On assiste alors à une recrudescence des signes généraux et à une aggravation des symptômes respiratoires. L'abattement devient important. Le jetage et le larmoiement sont maintenant purulents. La toux devient grasse et la dyspnée très nette. L'auscultation révèle des râles sibilants puis sous-crépitants.

L'évolution de la maladie peut se faire dans trois directions :

- vers la mort pour 2 à 20 % des animaux dans des délais variables mais parfois très brefs.
- vers la guérison en 8 à 10 jours avec ou sans séquelle
- vers la chronicité (broncho-pneumonie chronique ou abcès pulmonaire).

II . LES LESIONS (77), (103)

Les viscères thoraciques d'un animal mort de B. P. I. E. ne sont porteurs d'aucune lésion caractéristique de l'agent étiologique en cause, dans la majorité des cas.

On peut noter à l'ouverture de la cage thoracique une pleurésie sérofibrineuse. On trouve dans les régions antéro-inférieures du poumon, la juxtaposition de zônes congestionnées, atélectasiées et de foyers d'hépatisation à des stades divers. Dans les régions postérieures du poumon, on voit quelquefois des lésions d'emphysème. Les voies aériennes contiennent un exsudat mucopurulent.

III . SYMPTOMES ET LESIONS "PARTICULIERS" A CHAQUE VIRUS
(15), (42), (77), (109), (116), (117)

Aucun symptôme ou lésion ne peut être rattaché de façon caractéristique à l'un quelconque des virus.

Néanmoins le virus de la R. T. I. provoque l'apparition d'une conjonctivite importante avec quelquefois chémosis, une hypersécrétion de salive mousseuse, une rhinite catarrhale avec congestion intense, un cornage laryngé dû à un oedème du larynx. On note la présence de débrits nécrotiques au niveau du larynx et de la trachée sur une muqueuse très congestionnée.

Le virus de la maladie des muqueuses provoque souvent l'apparition d'ulcères. Le R. S. V. donne un emphysème pulmonaire parfois important.

CHAPITRE II : VIROLOGIE

A - VIRUS DE LA RHINOTRACHEITE INFECTIEUSE

I . HISTORIQUE (74), (85)

Le virus de la R. T. I. fût le premier virus à être définitivement associé aux maladies du tractus respiratoire des bovins.

Il fût isolé aux Etats-Unis par Madin et Al. en 1956, tandis que la maladie clinique avait été initialement décrite par Schroeder et Moys en 1954. Ensuite la maladie, en tant qu'affection du tractus respiratoire, fût rapportée en différents points du globe ; en Allemagne (Gründer et Al. 1960) ; en Nouvelle Zélande (Webster et Manktelow 1959) ; puis en Grande-Bretagne (Darbyshire et Al. 1962).

II . IMPORTANCE (24), (28), (38), (39), (118)

On constate un intérêt croissant vis-à-vis de cet Herpèsvirus dans les milieux professionnels.

En France, l'apparition de foyers authentiques a été contemporaine de l'évolution rapide des techniques d'élevage caractérisées par la création de grandes unités de bovins, laitiers ou à viande, et par l'importation d'animaux en provenance de pays fortement infectés.

Des enquêtes nationales réalisées dans les grandes exploitations

(plus de 50 animaux) montrent que le pourcentage actuel des animaux à sérologie positive est supérieur à 10 %. Les enquêtes ont souligné que, parmi les races atteintes, les Holstein arrivaient nettement en tête (environ 50 %) et que c'étaient surtout les animaux importés d'Amérique du Nord qui présentaient le plus fort taux de positivité. Enfin, ce sont les grands élevages qui sont les plus touchés, peut-être parce que ce sont eux qui importent le plus de vaches Holstein.

III . MORPHOLOGIE (80), (106)

Le virus de la R. T. I. possède une nucléocapside à symétrie cubique comportant 162 capsomères, d'une taille de 108 nm.

La nucléocapside contient l'acide nucléique ; elle est séparée de l'enveloppe par un "tégument" de matière encore imprécise.

Au microscope électronique on constate que les particules nues mesurent de 110 à 120 nm de diamètre et les particules enveloppées font environ le double.

IV . PROPRIETES PHYSIQUES ET CHIMIQUES (74), (80)

a) Propriétés biophysiques :

Le virus de la R. T. I., enveloppé, est sensible à l'éther, à l'alcool et à l'acétone. Il est stable à un pH égal ou supérieur à la neutralité ; dans ces conditions, sa survie est relativement bonne à basse température.
La densité des particules virales est de 1,22 g/cm^3, valeur relativement basse.

b) Propriétés biochimiques :

1) L'acide nucléique : il s'agit d'A. D. N. bicaténaire de densité : 1,730 g/cm^3 et de poids moléculaire : 54 x 10^6 daltons.

2) Les protéines : il existe au moins 21 protéines dont le poids moléculaire varie de 31 000 à 275 000 daltons.

V . POUVOIR PATHOGENE (74), (118)

Les souches indigènes d'Europe, plutôt bénignes jusqu'à présent, semblent subir un accroissement de leur pouvoir pathogène au cours de l'évolution de l'élevage. Ce pouvoir pathogène montre une grande variabilité, aussi bien qualitative que quantitative.

En effet, le virus peut montrer, outre le tropisme respiratoire, un tropisme digestif et génital. D'autre part, il existe des souches à l'origine de troubles bénins et d'autres à l'origine de manifestations graves.

VI . POUVOIR ANTIGENIQUE (37), (74)

Il y a unicité de la structure antigénique des différentes souches du virus de la R. T. I.

L'infection aboutit à l'établissement d'une immunité humorale et d'une immunité à médiation cellulaire. On peut ainsi mettre en évidence, d'une part, des anticorps neutralisants (sériques et locaux), des anticorps fixant le complément, des anticorps mis en évidence par Immuno-fluorescence, Hemagglutination passive, Immuno-diffusion..., et d'autre part, une hypersensibilité de type retardé mise en évidence par les tests d'hypersenbilité cutanée ou par l'inhibition de la migration des leucocytes.

B - VIRUS DE LA MALADIE DES MUQUEUSES

I . HISTORIQUE (61), (74)

En 1946, Olafson et Al. furent les premiers à parler d'infection à virus B. V. D. Puis en 1957, Underdahl et Al. isolèrent des agents cytopathogènes sur culture cellulaire de rein de bovin. Gillespie et Al., en 1960, isolèrent un virus cytopathique à partir de la rate d'un veau mort de maladie des muqueuses. Cette souche (C 24 V) devint la souche de référence dans les laboratoires du monde entier. Bürki montra que la plus grande teneur en virus se trouvait dans les muqueuses de la tête et du tractus intestinal.

II . IMPORTANCE (24), (39), (116), (118)

On observe environ 50 % de séropositivité dans les cheptels de tous les pays du monde. Mais la progression du virus est rapide : dans ces 10 dernières années, on a enregistré partout une augmentation de 10 à 20 % de la fréquence de séropositivité.

Plusieurs chercheurs accordent à ce virus un rôle primordial dans les pneumopathies des veaux. Bartha va plus loin, il lui attribue le rôle d'initiateur de tous les autres virus respiratoires. Il le considère comme le plus important facteur prédisposant. Les souches atténuées réduiraient la capacité de résistance naturelle des jeunes veaux âgés de moins de 6 mois et les rendraient vulnérables.

En France, nous sommes rarement en face de la forme classique, rapidement mortelle, bien connue aux USA, ni de la forme chronique, sporadique, mortelle, des adultes. Ce sont les souches plus ou moins atténuées, présentes dans 60 % du cheptel français, qui sont resposables d'entérites épidémiques tenaces avec morbidité élevée, caractérisées par des ulcérations dans l'appareil digestif des veaux et des jeunes bovins. Ces souches manifestent un tropisme marqué pour la muqueuse respiratoire des veaux de moins de 6 mois. L'enquête de 1976 a montré que la moitié des animaux environ possèdent des anticorps à la première prise de sang avec une augmentation des titres dans 25 % des cas.

III. MORPHOLOGIE (31), (61), (63)

Les virus de la maladie des muqueuses est un Pestivirus de la famille des Togaviridae. C'est un petit virus sphérique d'une taille de 40 à 70 nm qui possède une enveloppe lipo-protéique avec des lipides cellulaires et des glycopeptides spécifiques du virus entourant une nucléocapside à symétrie icosaédrale. Il contient une molécule unique d'A. R. N. de poids moléculaire de 4×10^6 daltons.

IV. PROPRIETES PHYSIQUES ET CHIMIQUES (30), (31)

Le virus B. V. D. est sensible à l'éther, au chloroforme, et à la trypsine. Il est labile à l'acide. Il est résistant au froid ; il conserve son pouvoir pathogène après un séjour de 20 jours en glace carbonique, ainsi qu'après une série de congélations et décongélations.

Par contre, il est inactivé par la chaleur ; après exposition de 15 mn à 50°c il perd son pouvoir pathogène.

V . POUVOIR PATHOGENE (74)

Le pouvoir pathogène est variable. Les souches naturelles atténuées montrent un pneumotropisme marqué. Le pouvoir pathogène du virus se traduit notamment par l'apparition d'ulcères au niveau de la muqueuse du tube digestif.

VI . POUVOIR ANTIGENIQUE (30), (63), (74)

Selon Gutekunst et Malmquist, le virus B. V. D. contient 2 antigènes. Le premier est lié à la particule infectante et induit l'apparition d'anticorps neutralisants. Le second est soluble, il induit l'apparition d'anticorps précipitants. Chez les animaux infectés expérimentalement, les anticorps précipitants peuvent être décelés plus tôts que les anticorps neutralisants. De même, dans les cultures cellulaires, l'antigène soluble apparaît plus tôt que la particule infectante.

Les antigènes de surface du virion sont responsables de l'adsorption des cellules et des érythrocytes sensibles. L'action hémagglutinante n'a jamais été décrite chez les Pestivirus.

C - VIRUS PARAINFLUENZA III

I . HISTORIQUE (24), (59), (74), (75), (85)

L'importance du PI_3 dans les affections respiratoires est connue depuis longtemps. En 1959, Reisinger et Al. isolèrent la souche SF_4 qui est utilisée depuis comme souche de référence. En France, Charton, Faye et Lecoanet l'isolent en 1965 d'une lésion d'hépatisation pulmonaire d'un veau de 6 jours issu d'une exploitation où sévit une épizootie avec morbidité et mortalité importante.

II . IMPORTANCE (24), (39), (59), (117), (118)

Le virus PI_3 est le plus fréquent de tous les virus respiratoires. En France, les enquêtes sérologiques montrent qu'un grand nombre d'animaux possèdent des anticorps : en moyenne 80 % des adultes et 60 à 75 % des veaux ; c'est entre 5 et 17 mois que les bovins présentent le plus faible taux de réactions positives.

Si, plus des 2/3 des animaux possèdent des anticorps à la première prise de sang, en revanche, les montées du titre signant une atteinte virale ne s'observent que peu souvent (chez moins de 10 % des animaux).

III . MORPHOLOGIE (59), (75), (106)

Le virus PI_3 est un gros virus enveloppé de la famille des paramyxoviridae, de 180 à 300 nm de diamètre, à acide ribonucléique

et à symétrie hélicoïdale. Toutes les particules ne sont pas mises en évidence au microscope électronique, mais les préparations sont riches en composant interne hélicoïdal caractéristique de 18 mμ de large avec une hauteur d'environ 6 mμ. L'hélice centrale de nucléoprotéine a un diamètre de 150 Å environ. Une membrane contenant les unités hémagglutinantes entoure le tout.

IV . PROPRIETES PHYSIQUES ET CHIMIQUES (59), (75), (85), (128)

La composition chimique globale est : 0,91 % d'A. R. N., 73 % de protéines, 20 % de lipides et 6,1 % de glucides. Les lipides sont associés à l'enveloppe, ils ont pour origine ceux de la membrane cellulaire. Le virus PI_3 est donc sensible à l'action des solvants des corps gras. Il est inactivé par les acides, les ions ammonium, ainsi que par la chaleur et les ultra-violets. On peut le conserver plusieurs semaines à 4°c et plusieurs mois à -70°c.

V . PROPRIETES HEMADSORBANTES ET HEMAGGLUTINANTES (7), (59), (75), (128)

Elles sont intéressantes pour le titrage du virus. Le virus PI_3 agglutine les érythocytes d'oiseaux, de bovins, d'agneaux, de cobaye et les érythrocytes humains de type O. Les plus hauts titres sont obtenus avec les cellules de cobaye.

En ce qui concerne l'hémadsorption, les hématies de cobaye donnent les meilleurs résultats (mais les hématies humaines de type O et celles de poules sont utilisables).

Les souches de virus PI_3 peuvent être divisées en 2 ou 3 sous-groupes sur la base de leur activité hémagglutinante des hématies des différentes espèces et de leur sensibilité à la chaleur.

VI . POUVOIR PATHOGENE (74), (128)

Le virus peut être isolé à partir des sécrétions nasales, 7 à 8 jours après son inoculation et en 17 jours dans le poumon. L'examen histologique révèle une bronchiolite et une alvéolite avec des corps d'inclusion intracytoplasmiques acidophiles dans les cellules de l'épithélium nasal et bronchique et dans les macrophages alvéolaires.

VII . POUVOIR ANTIGENIQUE (7), (59)

Le virus PI_3 possède deux fractions antigéniques :

- l'antigène soluble, ou AgS, est spécifique de type. Il est en relation avec les sous-unités protéiques associées à l'A. R. N. Cet antigène est lié à l'apparition d'anticorps fixant le complément ; ces anticorps ne neutralisent pas le virus et n'inhibent pas l'hémagglutination.

- l'antigène de surface, ou AgV, induit la formation des anticorps neutralisants et protecteurs. Il est lié à l'enveloppe virale.

D - LE VIRUS RESPIRATOIRE SYNCYTIAL BOVIN

I . HISTORIQUE (74), (75)

Des anticorps neutralisant le virus syncytial respiratoire humain furent décelés dans des sérums de bovins par Doggett et Al. en 1968. Depuis le virus syncytial respiratoire bovin fut isolé en Europe (Paccaud et Jacquier : 1970 ; Wellemans et Al. : 1970 ; Jacobs et Edington : 1971) ; au Japon (Inaba et Al. : 1972) et aux Etats-Unis (Rosenquist : 1974 ; Mohanty et Al. : 1975 ; Smith et Al. : 1975).

II . IMPORTANCE (24), (62), (77), (83), (117), (118)

Le R. S. V. est considéré par les vérérinaires belges comme l'un des plus importants virus respiratoires bovins.

Aucun isolement du R. S. V. n'a été rapporté en France, ce qui ne signifie pas pour autant qu'il n'y joue aucun rôle.

Le R. S. V. est l'un des derniers virus à avoir été mis en cause en raison de la difficulté manifeste de l'isoler en cultures cellulaires, cependant, il constituerait plus de 40 % des interventions virales dans les pneumopathies. Une enquête publiée en 1979 donne la répartition du virus syncytial respiratoire chez les bovins français :

- Importance du pourcentage des animaux après 6 mois,
- Pas d'influence de la race,
- Pas d'influence entre les problèmes respiratoires antérieurs dans une exploitation et le pourcentage de

sérums positifs. On peut en déduire que le rôle pathogène du R. S. V. est faible.

III . MORPHOLOGIE (75)

Ce virus est un membre de la famille des Métamyxoviridae. Il a un diamètre d'environ 1 200 à 1 300 Å. Le virion possède un corps formé par un filament central hélicoïdal entouré d'une membrane externe.

IV . PROPRIETES PHYSIQUES ET CHIMIQUES (7), (75), (98)

Le R. S. V. survit à -70°c, il est sensible à la chaleur, il est inactivé en une heure à 56°c et en 170 heures à 37°c. C'est un virus à A. R. N. de densité de 1,225 en chlorure de Césium. Il est extrêmement fragile, labile aux acides, sensible aux sovants lipidiques (Ether, chloroforme...).

Aucun pouvoir hémagglutinant ou hémadsorbant n'a jusqu'aujourd'hui été rapporté au sujet du R. S. V.

V . POUVOIR PATHOGENE (74), (75), (98), (122)

Il est semblable à celui du virus PI_3.

Le R. S. V. provoque aussi bien des épizooties de rhinite que des affections asymptomatiques.

Du point de vue histologique, il se caractérise par la présence d'inclusions éosinophiles intracytoplasmiques dans les cellules atteintes.

VI . POUVOIR ANTIGENIQUE (74)

Le virus respiratoire syncytial bovin a des propriétés antigéniques proches de celles du virus respiratoire syncytial humain. Jacobs et Edington, 1975, émettent l'hypothèse que le R. S. V. humain puisse infecter les bovins, qui alors deviendraient un réservoir d'infection pour l'homme, et vice versa.

E - LES ADENOVIRUS

I . HISTORIQUE (2), (7), (24), (29), (74), (85), (88)

La première démonstration de la présence des adénovirus chez les bovins fut faite par Klein et Al en 1959 qui isolèrent une souche à partir de feces d'une vache apparemment en bonne santé aux Etats-Unis. Peu de temps après, une seconde souche fut découverte par Klein et Al. (1960) sur un veau apparemment normal. Cette souche était antigénitiquement différente, et maintenant ces deux souches représentent les types 1 et 2. Plus tard, Darbyshire (1968) réalisa l'isolement d'une autre souche (WBR 50) du type 1 à partir du mucus nasal d'un veau atteint de pneumonie. Un troisième sérotype fut isolé en Grande-Bretagne par Darbyshire, puis furent isolés tour à tour les types 4 et 5 (Bartha et Aldasi 1966) ; 6 (Rondhnis, 1968) ; 7 (Matumoto, 1969) ; 8 (Bartha, 1970) et 9 (Guenov, 1971). La première hypothèse que les adénovirus pouvaient être associés aux maladies respiratoires des bovins, fut faite par Darbyshire et Pereira (1964).

II . IMPORTANCE (24), (39), (117), (118)

L'enquête de 1976 montre que 90 % des animaux possèdent des anticorps. Les titres sériques augmentent chez 25 % de ces animaux. Les adénovirus jouent donc un rôle dominant dans la génèse des affections virales. Cependant, ce sont plutôt des agents facultatifs et associés, principalement sur les jeunes veaux de 1 à 6 mois.

III . MORPHOLOGIE (88), (106)

Les adénovirus bovins, classés dans le genre Mastadénovirus, ont un diamètre de 70 à 85 mμ, ils sont dépourvus d'enveloppe et possèdent des capsomères arrangés selon une symétrie cubique. Il s'agit de virus à A. D. N.

IV . PROPRIETES PHYSIQUES ET CHIMIQUES (88)

Les adénovirus sont résistants à l'éther et au chloroforme. Ils sont stables à des pH compris entre 3 et 8 ; la capside se dissocie à pH 10,5. Le pouvoir infectieux est généralement détruit par chauffage à 56°c pendant 30 mn. Ces virus sont stables à la température du laboratoire. Les ultra-violets ont un effet inhibiteur variable d'un type à l'autre.

V . POUVOIR PATHOGENE (29), (32), (77), (88), (96), (117)

Les adénovirus sont des agents à caractère pathogène plutôt facultatif qui, dans les conditions naturelles et activés par d'autres virus, peuvent être à l'origine d'affections respiratoires et parfois intestinales graves chez les jeunes veaux.

Les adénovirus provoquent l'apparition d'inclusions intranucléaires dans les cellules épithéliales des bronchioles, dans les cellules septales et dans les ganglions lymphatiques. Parmi les neuf types d'adénovirus, les types 1 à 5 semblent le plus souvent en cause dans les affections respiratoires avec une prédominance du type 3.

VI . POUVOIR ANTIGENIQUE - HEMAGGLUTINATION (7), (29), (72) (74), (88), (96)

Trois fractions antigéniques peuvent être mises en évidence chez les adénovirus. L'antigène A, antigène de groupe, correspond aux capsomères hexagonaux et entraîne la production d'anticorps fixant le complément.
L'antigène B (facteur toxique, antigène cellulo-détachant correspond aux sous-unités des 12 sommets de l'icosaèdre. L'antigène C (Hémagglutinine) correspond à la fibre.

Le pouvoir hémagglutinant est variable en fonction des souches et des types. Par exemple le type 1 agglutine les érythrocytes de rat, le type 2 les érythrocytes de rat et de souris, le type 3 les érythrocytes de rat et de singe.

On propose de classer les adénovirus en 2 groupes :

- le groupe 1 (types 1 à 3) : caractéristiques identiques aux adénovirus humains.

- le groupe 2(types 4 à 9) : propriétés similaires aux adénovirus aviaires, sans antigène soluble commun aux adénovirus humains en fixation du complément.

F - LES REOVIRUS

I . HISTORIQUE (69), (74), (77)

Les réovirus ont été isolés à partir du tractus respiratoire et du tractus digestif des bovins par Rosen et Al. en 1963. Ils sont sérologiquement identiques aux sérotypes humains, et on les sépare en trois sérotypes.

II . IMPORTANCE (39), (62)

La fréquence et le pouvoir pathogène expérimental de certaines souches en association avec des chlamydiacées et des pasteurelles les font considérer par de nombreux auteurs comme les principaux responsables de certaines lésions pulmonaires.

L'enquête de 1976 montre qu'on trouve des anticorps chez moins de 50 % des animaux à la première prise de sang, avec des montées des titres peu nombreuses (1 fois sur 7).

III . MORPHOLOGIE (69), (74), (106)

Les réovirus, de la famille des Réoviridae, sont des virus icosaédriques de 60 à 75 nm de diamètre, contenant de l'A. R. N. bicaténaire.

Les capsomères ont une longueur de 15 mμ environ et sont apparemment creux. Aucune enveloppe n'est mise en évidence.

IV . PROPRIETES PHYSIQUES ET CHIMIQUES (56), (69)

Les réovirus sont résitants au chloroforme et à l'éther. Les types 1 et 3 sont stables à des pH allant de 2,8 à 8. Ils sont peu sensibles à la chaleur mais rapidement inactivés par les ultra-violets.

V. POUVOIR PATHOGENE (56), (69), (74)

Si on inocule des veaux avec les réovirus, on retrouve des lésions pulmonaires chez tous les animaux autopsiés après 4 à 7 jours. Ce sont des lésions exsudatives puis prolifératives.

VI . POUVOIR ANTIGENIQUE - HEMAGGLUTINATION (56), (69), (99)

Les réovirus possèdent trois fractions antigèniques :

- un antigène commun fixant le complément,
- deux antigènes spécifiques, l'un faisant apparaître les anticorps neutralisants ; l'autre étant une hémagglutinine qui a permis de classer les réovirus en 3 sérotypes.

Tous les types hémagglutinent les érythrocytes humains (surtout du groupe A et AB). Le type 3 agglutine les érythrocytes bovins.

L'inhibition de l'hémagglutination révèle des relations antigéniques entre les 3 types de réovirus, mais les types 1 et 2 apparaissent plus étroitement liés entre eux qu'au type 3.

G - LES RHINOVIRUS

I . HISTORIQUE (74), (85)

Le premier isolement de rhinovirus bovin eu lieu en Allemagne (Bögel et Böhm, 1962). Cette souche, SD-1, aux propriétés identiques à celles des rhinovirus humains, fut isolée à partir du mucus nasal d'un veau de 8 semaines, présentant des troubles respiratoires. SD-1 est la souche de référence du rhinovirus type 1. Depuis de nombreuses souches ont été isolées dans le monde aussi bien à partir de bovins normaux que de bovins atteints d'affections respiratoires. La souche de référence EC-11 du rhinovirus type 2 fut isolée par Reed et Al. (1971) en Angleterre.

II . IMPORTANCE (74)

La participation des rhinovirus dans la pathologie respiratoire des bovins est difficile à apprécier. En effet, ces virus sont isolés avec une fréquence égale chez les animaux malades et les animaux sains. Il semble que les veaux soient plus sensibles à l'infection entre 2 et 6 mois.

III . MORPHOLOGIE (21), (51)

Les rhinovirus font partie de la famille des Picornaviridae et sont en tant que tel des petits virus à A. R. N. Les particules virales se présentent sous des contours hexagonaux avec une taille moyenne de 25 à 30 mμ . Ils ont une densité de 1,40g/ml en chlorure de césium. Ils sont dépourvus d'enveloppe.

IV . PROPRIETES PHYSIQUES ET CHIMIQUES (18), (21),(51), (55),(84),

Les rhinovirus sont labiles à la chaleur. Chauffées à 56°c, les souches sont rapidement inactivées. A 37°c, le titre de la solution virale baisse en moyenne de moitié en 1 heure. Le stockage à 4°c est recommandé pour une période de 2 jours et à - 60°c pour des périodes plus longues.

Tous les rhinovirus sont très sensibles aux acides et ils sont tous inactivés à pH 3.

Ce sont des virus à A. R. N. monocaténaire qui ne sont pas inactivés par le chloroforme ou l'éther.

V . POUVOIR PATHOGENE (18), (52), (73), (74), (85)

Dans l'infection naturelle ou expérimentale, les rhinovirus bovins sont isolés seulement à partir des sécrétions nasopharyngées, la période de détection variant de quelques jours à 22 jours. Tous les efforts pour trouver le virus dans les feces ou dans le sang des veaux infectés ont échoué. Cette restriction d'affinité au tractus respiratoire est une différence nette par rapport aux autres virus respiratoires.

Il est probable que ce virus n'aie pas une grande importance en tant qu'agent primaire causal de la maladie. En effet, après inoculation intranasale à des veaux nouveaux-nés privés de colostrum, aucun ne montre de signes cliniques, mais on observe malgré tout des lésions microscopiques de rhinite focale après le 14ème jour.

VI . POUVOIR ANTIGENIQUE (49), (73), (74)

Il n'existe qu'une faible différence antigénique entre les rhinovirus de type 1 et 2. L'infection à rhinovirus bovins provoque l'apparition à des taux très faibles d'anticorps neutralisants ou fixant le complément. D'autre part ils entraînent une réponse immunitaire à médiation cellulaire mise en évidence par le test d'inhibition de la migration des leucocytes.

D E U X I E M E P A R T I E

LE DIAGNOSTIC EXPERIMENTAL

CHAPITRE I : PRINCIPES GENERAUX DU DIAGNOSTIC

I . DIAGNOSTIC CLINIQUE (77), (109)

Le diagnostic clinique de bronchopneumopathie infectieuse enzootique est facile. Les conditions d'apparition, la contagiosité, l'hyperthermie et les symptômes respiratoires énoncés précédemment orientent rapidement le clinicien vers le diagnostic, mais, dans la majorité des cas, il lui est impossible de préciser l'agent causal, ce qui est fondamental pour mener à bien un traitement et une prophylaxie efficace.

II . DIAGNOSTIC ETIOLOGIQUE (77), (79), (101)

La multiplicité des virus, des bactéries, des facteurs de stress et d'ambiance qui, de manière autonome ou associée, peuvent causer des maladies respiratoires analogues par leur évolution clinique, constitue la raison principale de la complexité et de la difficulté du diagnostic. Ni les données cliniques, ni les données anatomo-pathologiques ou épizootologiques ne permettent de connaître avec certitude l'agent causal, c'est pourquoi il faut procéder dans tous les cas à des examens de laboratoire.

On peut alors établir le diagnostic de n'importe quelle infection respiratoire virale de deux manière :

- la mise en évidence de l'antigène viral dans les organes lésés des animaux malades ou morts, ou l'isolement du virus de ces mêmes organes et des sécrétions et excrétions.

- la mise en évidence des anticorps spécifiques dans le sang des animaux malades ou ayant été contaminés (éventuellement dans le mucus nasal).

Le choix de l'une ou l'autre de ces méthodes est d'abord fonction de la forme et du stade de l'affection :

- si on se trouve en phase aigüe de la maladie, on a recourt, si possible, au diagnostic direct (isolement viral, ou immunofluorescence).

- si on se trouve devant une forme chronique, ou ancienne, ou lors d'enquêtes, on utilise le diagnostic indirect (sérologie).

Ce choix est aussi lié aux caractéristiques culturales de l'agent en cause et de son aptitude à supporter les manipulations (exemple : le virus R. S. V. est très difficile à manipuler).

CHAPITRE II : LES PRELEVEMENTS

Le diagnostic de laboratoire sera pratiqué à l'aide de prélèvements opérés par le praticien. Il n'est pas exagéré de dire que ce prélèvement est le temps essentiel du diagnostic expérimental, celui qui conditionne pour la plus grande part le succès de la recherche. Aussi le praticien doit-il y apporter tous les soins et disposer du matériel indispensable : flacons, tubes et écouvillons stériles.

Deux autres éléments majeurs conditionnent la valeur du diagnostic : le choix du moment des prélèvements ; le délai et les conditions d'acheminement au laboratoire.

I . LES PRISES DE SANG (22), (43), (65), (103), (109)

Quelle que soit la forme de la maladie en cause, et d'ailleurs quelle que soit l'affection virale suspectée, le premier prélèvement sera constitué par du sang pour mettre en évidence les anticorps sériques. On le recueille en tube stérile, sans anticoagulant et on le laisse exsuder 2 ou 3 heures à température ambiante avant de le placer au réfrigérateur.

A - PRINCIPE

La première prise de sang, "prise de sang précoce", sera pratiquée sur les sujets malades dès les premiers signes de la maladie ainsi que sur quelques sujets encore apparemment indemnes.

Elle doit être réalisée le plus rapidement possible afin de faire le bilan immunologique de l'animal avant l'évolution de la maladie.

Le second échantillon, "prise de sang tardive", sera prélevé 2 ou 3 semaines plus tard sur les mêmes animaux ; il permettra de détecter une éventuelle modification sérologique significative.

Il est indispensable de disposer du sang de plusieurs sujets car certains malades authentiques ne fabriquent pas d'anticorps en quantité décelable.

B - QUANTITE ET CONDITIONNEMENT

Il est nécessaire de prélever 10 ml de sang environ en tube de verre (il y a des risques d'hémolyse dans les tubes en matière plastique). Il est aussi indispensable d'identifier chaque tube avec, par exemple, le numéro d'immatriculation de l'animal.

C - EXPEDITION

Si possible, l'expédition des prises de sang doit être immédiate ; dans le cas contraire il faut les conserver au réfrigérateur (pas au congélateur) jusqu'au moment de l'expédition qui ne doit pas être faite en fin de semaine ou la veille d'un jour férié.

L'acheminement se fait par l'intermédiaire des P et T selon les règles imposées et définies par la convention postale universelle (J. O. du 28-9-76, article 119 : "conditionnement des matières biologiques périssables").

D - VALEUR DIAGNOSTIQUE (65), (103)

Selon que le prélèvement de sang est effectué sur un seul animal ou sur plusieurs, et que ce prélèvement est unique ou couplé (P.S. précoce et P.S. tardive), quatre éventualités se présentent :

1) Prélèvement unique sur un seul animal :

Cet examen isolé n'a pas de valeur diagnostique car l'interprétation des résultats est multiple. Un résultat négatif doit être interprété dans un contexte clinique précis : en effet la prise de sang a pu être réalisée trop tôt par rapport au début de la maladie et les anticorps n'ont pas pu encore apparaître à un taux décelable, ou bien au contraire le contact infectant est trop lointain pour que les anticorps aient pu persister. De même, si le résultat est positif, les anticorps ont pu être transmis passivement (immunité colostrale ou sérothérapique) ou bien ils résultent d'un réel contact avec le virus. A noter qu'il n'est généralement pas possible de distinguer les anticorps induits par les souches sauvages pathogènes de ceux suscités par les souches apathogènes sauvages ou vaccinales.

2) Prélèvement unique sur plusieurs animaux :

L'interprétation des résultats est, bien sûr, améliorée lorsqu'on dispose des sérums de plusieurs animaux du même troupeau et de commémoratifs précis. Cette méthode rend ainsi des services pour estimer, en première approximation, l'incidence d'un virus dans

une population. Mais dans l'immense majorité des cas, aucune conclusion ne peut être tirée d'un tel examen.

3) Prélèvement couplé sur un seul animal :

Il permet théoriquement de suivre la cinétique des anticorps, mais le choix d'un animal déterminé pour le prélèvement peut ne pas être judicieux.

4) Prélèvement couplé sur plusieurs animaux :

C'est la solution idéale et c'est la seule qui, en général, permet de tirer des conclusions valables, dans la mesure du moins où les animaux soumis au prélèvement ont été judicieusement choisis. Ils permettent de faire une étude dynamique du taux des anticorps. Cette étude est plus riche en renseignements : une séroconversion ou une cinétique ascendante signera un contact récent avec le virus, un taux stationnaire évoquera un contact plus lointain et une courbe descendante du taux d'anticorps traduira la vidange des anticorps le plus souvent transmis passivement par le colostrum.

Cette modalité est d'autant plus intéressante que la première prise de sang est proche du début de la maladie. Elle seule, avec l'isolement du virus, permet de conclure sérieusement à l'évolution d'une infection virale chez un animal.

Cependant, le résultat de l'examen de deux sérums couplés n'est connu qu'un mois après l'apparition de la maladie ; on mettra donc simultanément en oeuvre les techniques d'isolement du virus.

II . L'ECOUVILLONNAGE NASAL (43), (103), (109)

En même temps que la première prise de sang, on récolte des matières virulentes sur les mêmes animaux pour essayer d'isoler le virus et de l'identifier.

A - PRINCIPE

Il faut prélever du mucus nasal au stade de multiplication du virus au niveau de la pituitaire. Cette phase est en général de courte durée et se situe au tout début de la maladie (phase d'hyperthermie). En dehors de cette période la présence du virus est aléatoire. Il est donc inutile de faire des prélèvements sur des animaux malades depuis plusieurs jours, présentant un jetage muqueux ou mucopurulent qui signe une complication bactérienne.

Si le choix des animaux est judicieux, 4 ou 5 prélèvements sont suffisants.

B - REALISATION ET CONDITIONNEMENT

L'irrigation des cavités nasales représenterait la méthode de choix. A l'aide d'une grosse seringue, on injecte dans les cavités nasales de l'animal solidement maintenu, 30 à 50 ml de milieu pour culture cellulaire qu'on recueille dans un plateau stérile avant de le réinjecter, l'opération étant renouvelée plusieurs fois.

Mais dans la pratique, la technique la plus employée est l'écouvillonnage nasal qui est peut-être moins fidèle, mais qui est

plus simple à mettre en oeuvre. Pour cela, on introduit après nettoyage à sec du mufle et de l'orifice nasal visé (avec du coton ou un essuie-main propre), un écouvillon stérile ordinaire (ou un coton tige souple) dans le méat nasal ventral en s'assurant que le tampon ne touche la muqueuse qu'à l'intérieur de la cavité nasale. Recouvert de sécrétions, l'écouvillon est retiré de la même façon et placé dans un petit tube à essai. Il peut être mieux protégé des souillures si on l'introduit dans la cavité nasale, caché à l'intérieur d'un tube en matière plastique souple de diamètre approprié (1 cm environ), stérile, et si on le retire après l'avoir brièvement découvert et à nouveau protégé.

(On peut aussi rechercher les anticorps locaux ; pour cela, il faut davantage de sécrétions nasales et on peut les prélever par tamponnement à l'aide d'une petite éponge stérile en polyuréthane de 10 à 15 cm de longueur et de 2 à 3 cm de diamètre. Il suffit ensuite d'extraire le liquide par pression ou par centrifugation) (109).

Notons que des écouvillons spéciaux à long manche sont fournis sur demande par le laboratoire de pathologie bovine, ainsi que des tubes pour le transport.

Il faut congeler ces prélèvements immédiatement, de préférence dans un congélateur plûtot que dans un freezer.

C - EXPEDITION

L'expédition se fait de préférence sous emballage isotherme ; en boîte de polystyrène expansé par exemple, en présence de glace

et par "Express". L'état de conservation du prélèvement lors de son arrivée au laboratoire conditionne les possibilités d'exploitation. Il est préférable d'éviter les intermédiaires, comme les laboratoires des D. S. V. qui ne pratiquent pas, en général, l'isolement des virus en culture cellulaire. Peu de laboratoires en France acceptent de tels diagnostics, et le laboratoire national de pathologie bovine de Lyon qui a entrepris une enquête sur les maladies respiratoires des bovins, serait parfaitement indiqué pour centraliser les prélèvements.

D - VALEUR DIAGNOSTIQUE (58), (103)

L'isolement d'un virus à partir d'un écouvillon et son identification en culture cellulaire constitue une très forte présomption d'intervention de ces agents infectieux. (Cependant, l'expérience montre que les isolements du virus ne sont pas la règle générale, ceci tenant au fait que les prélèvements n'ont pas été réalisés au moment opportun ou qu'ils n'ont pas été conservés et transportés dans les conditions appropriées).

La présomption devient une certitude si, sur les animaux du même groupe sont relevés dans le même temps, des séroconversions ou des montées d'anticorps contre le virus isolé en culture cellulaire. La nécessité de prélèvements conjoints pour la sérologie et la virologie, trouve ici sa pleine justification.

III - LES ORGANES (43), (109)

Toujours pour isoler le virus, ou le mettre en évidence, il est opportun de prélever sur le cadavre des fragments d'organe appropriés.

A -PRINCIPE

En cas de maladies respiratoires, il faut prélever les organes suivants :

- des fragments de muqueuses des cornets, du larynx et de la trachée,
- des fragments de rate et de poumon de la grosseur d'un poing,
- éventuellement des ganglions trachéobronchiques et des fragments de foie.

B - REALISATION ET CONDITIONNEMENT

Ces prélèvements doivent être pratiqués le plus tôt possible après la mort de l'animal, dans un délai maximum de 6 heures, avant l'autolyse ou la putréfaction des tissus.

On découpe un bloc le plus compact possible et dans les meilleurs conditions de propreté et on le place dans un sac en plastique que l'on congèle dans les meilleurs délais.

C - EXPEDITION

Les conditions de transport sont les mêmes que pour les écouvillonnages. Il est souhaitable de saupoudrer les fragments d'organes de pénicilline, par exemple, ce qui retarde le développement bactérien dans le cas où la chaîne du froid serait interrompue. Il est en effet illusoire de rechercher un virus dans un prélèvement putréfié.

D - VALEUR DIAGNOSTIQUE

Elle est la même que celle des écouvillonnages.

IV . LES COMMEMORATIFS (28), (109)

Il est important de joindre aux prélèvements des commémoratifs clairs, précis et complets relatant outre les caractères épidémiologiques, cliniques et lésionnels de la maladie, toutes les informations sur les conditions d'élevage nécessaires à l'orientation des recherches et à l'interprétation des résultats.

L'idéal est de répondre à un questionnaire bien agencé comme celui proposé par les G. T. V. (109).(cf annexe 1).

AFFECTIONS BOVINES - FICHE DE RENSEIGNEMENTS (annexe 1)

EXPEDITEUR : Laboratoire Départemental
Direction des Services Vétérinaires de (1) Dépt

Référence

Exploitation : Vétérinaire traitant : Dr

Commune : Dépt à Dépt

1. Le prélèvement :

1.1 Nature : sang (2) organe écouvillonnage Nombre

autre à préciser

1.2 Date :

1.3 Prélèvement effectué par : Vétérinaire traitant D.S.V. Labo Autre

2. Les examens demandés :

2.1 Nature de l'affection à rechercher : (à préciser)

2.2 Nature des examens demandés : Virologique Sérologique
Bactériologique Hématologique Histologique

Autre à préciser :

2.3 Motif ayant incité à envoyer des prélèvements :

Suspicion clinique Enquête épidémiologique

Visite d'achat Introduction d'animaux nouveaux
Règlement relative à l'importation à l'exportation

Autre motif à préciser

3. Les commémoratifs :

3.1 L'élevage :
3.1.1 Importance numérique : 1-10 11-50 51-100
101-200 201-500 501-1000

3.1.2 Effectif total : Mères Jeunes

3.1.3 Type d'élevage : Traditionnel Industriel
Nurserie Atelier d'engraissement
Préciser le nombre de cycles par an
le nombre d'animaux par cycle

3.1.4 Modalités d'entretien : Plein air semi-plein air
Stabulation libre Stabulation à l'attache

---

(1) = Rubrique à compléter

(2) = Rubrique à marquer d'une croix

3.1.5 Type de ventilation : Statique Dynamique

3.2 L'alimentation :

3.2.1 Veaux : - ingestion du colostrum : oui non non précisé
- alimentation au lait maternel au lait reconstitué

3.2.2 Animaux sevrés : type d'alimentation :

3.3 Les animaux :

3.3.1 Origine : nés dans l'exploitation achetés à l'extérieur

3.3.2 Dans ce cas, à quel âge ?

3.3.3 Modalités d'identification :

3.4 La maladie :

3.4.1 Date d'apparition des premiers symptômes :

3.4.2 Nombre de malades :

3.4.3 Age des malades :

3.4.4 Nombre de morts :

3.4.5. Symptômes : dominante : générale respiratoire
digestive génitale nerveuse autre (préciser)

Description sommaire des symptômes :

3.4.6 Lésions : description sommaire

3.4.7 Traitements entrepris :

3.4.8. Examens pratiqués et résultats :

CHAPITRE III : LES DIFFERENTES METHODES DU DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE

De très nombreuses techniques sont à l'heure actuelle utilisées tant pour identifier les virus que pour mettre en évidence les témoins de l'infection. C'est l'étude de ces méthodes qui fera l'objet de cette partie principale. Dans le soucis d'éviter les répétitions, nous étudieront successivement, de manière concise, les différentes techniques utilisées en insistant à chaque fois sur les particularités intéressant chaque virus.

L'ordre utilisé dans l'énumération de ces méthodes n'est que le reflet de l'importance de la bibliographie concernant chacune d'elles.

A - CULTURE ET EFFET CYTOPATHOGENE

Avant d'aborder l'étude des techniques proprement dites, il est nécessaire de mentionner les caractères culturaux des différents virus ainsi que leurs effets cytopathogènes.

En effet, la culture du virus représente une étape indispensable pour son isolement et sa mise en évidence, et l'effet cytopathogène est souvent un élément important et précoce de première orientation du diagnostic.

1) Virus de la Rhinotrachéite infectieuse (7),(25),(37),(80), (103), (12

Isolement, culture et identification du virus de la R. T. I.,

s'opèrent généralement par ensemencement sur cultures cellulaires à partir de broyats d'organes, de sécrétions ou d'écouvillonnages.

L'ensemble des opérations ne pose aucun problème technique sérieux, le virus de la R. T. I. étant assez résistant notamment à la température pour qu'il ne soit pas détruit dans les prélèvements pendant les transports.

La culture est aisée et rapide. Les cellules rénales primaires ou secondaires de foetus bovin ou ovin sont les plus sensibles. De nombreuses cellules de bovin, de porc, de chat, de mouton, permettent au virus de se développer, moins rapidement toutefois.

L'effet cytopathogène en culture cellulaire est assez caractéristique et rapide ; il apparaît en 15 à 48 heures. Il se traduit par la formation d'inclusions intranucléaires éosinophiles et de petits syncytia.

Outre la rapidité d'exécution et d'apparition de l'E. C. P., outre la facilité qu'a le virus de se développer sur toute une série de cellules de laboratoire, le test d'isolement viral a une qualité essentielle : la sensibilité.

En effet, le virus persiste pendant au moins une semaine dans les organes atteints. Cette persistance du virus n'est certainement pas aussi longue lorsqu'il s'agit d'autres virus respiratoires.

2) Virus de la maladie des muqueuses (30),(40),(61),(82)

L'isolement du virus en culture a longtemps posé un problème, car les souches non cytopathogènes ne se manifestent pas sur les cultures cellulaires.

a) Cas des souches cytopathogènes :

Les cultures cellulaires utilisées proviennent de cellules rénales ou testiculaires de veaux. La multiplication du virus est relativement précoce. Les lésions cellulaires sont alors assez caractéristiques ; ce sont des foyers de dégénérescence dans lesquels les cellules présentent un cytoplasme vacuolisé, granuleux, souvent rétracté et un noyau fortement picnotique.

b) Cas des souches non-cytopathogènes :

Pour révéler dans une culture la présence d'un virus sans pouvoir cytopathogène, il existe plusieurs techniques indirectes.

+ Méthode d'interférence homologue (30)

La souche en testage empêche la croissance dans la culture cellulaire d'une souche dont le pouvoir cytopathogène est quant à lui connu. Ceci empêche donc l'apparition des lésions cellulaires caractéristiques.

+ Méthode E. N. D. (Exaltation Newcastle Disease) adaptée au virus B. V. D. (30), (53), (82)

Le pouvoir cytopathogène du virus de la maladie de Newcastle est exalté par le virus B. V. D. L'effet cytopathogène peut alors être neutralisé par un sérum spécifique riche en anticorps

provenant de lapins ou de veaux.

La plupart des souches du virus B. V. D. produisant un E. C. P. très faible ou même inexistant, des tests très spécifiques sont nécessaires : l'utilisation des anticorps fluorescents semble être une technique de choix.

3) Virus Parainflenzae III (7),(19),(25),(42),(59),(75)

Le virus PI_3 pousse bien inoculé dans la cavité amniotique de l'oeuf embryonné. Il pousse aussi sur les cultures de cellules de nombreux tissus humains et animaux.

Seules les souches bovines SF_4 montrent un effet cytopathogène sur les cellules de rein de veau, en entraînant en 36 à 48 heures l'apparition d'inclusions éosinophiles intranucléaires et intracytoplasmiques.

Les cellules de rein de singe sont les meilleurs pour un premier isolement du virus PI_3 mais le plus souvent, l'E. C. P. caractéristique n'apparaît qu'au cours des passages successifs du virus sur ces cultures. Cet E. C. P. consiste alors en une désorganisation de la structure cellulaire, la cellule prenant une forme allongée et effilée, conférant à la zone atteinte un aspect réticulé à larges mailles, et on assiste en outre à la formation de syncytia.

Sur cultures cellulaires Hela ou Kb, le virus entraîne l'apparition de gros syncytia se perforant au centre et conférant à la culture un aspect criblé typique (et les inclusions vues précédemment).

On obtient également de bons résultats sur cultures cellulaires de veau et de mouton (rein, muscle, trachée, poumon), mais il est important d'utiliser dans les milieux de croissance des sérums dépourvus d'anticorps anti-PI_3 car les sérums bovins en contiennent fréquemment. Les cultures étant incubées à 37°c, on observe nettement l'E. C. P. vers le 5^e, 6^e jour. On peut, de façon plus précoce révéler la présence du virus en soumettant les cultures au test d'hémadsorption ou d'hémagglutination.

4) Virus respiratoire syncytial (57),(67),(75),(98),(1
(120),(122),(123)

L'isolement du virus R. S. V. se fait le plus souvent sur cultures cellulaires de rein ou de testicule d'embryon de bovin (BEK et BET). Les changements cytopathiques consistent en une élongation et un rétrécissement de la cellule avec des degrés variables de vacuolisation du cytoplasme. Les noyaux deviennent picnotiques et excentriques. Les cultures BET primaires infectées montrent des inclusions basophiles intranucléaires entourées d'une zone claire, de fragmentation de la chromatine et de vacuolisation cytoplasmique.

La coloration à l'hémalun-éosine de la culture infectée met en évidence des syncytia avec un nombre de noyaux assez restreint. Dans le cytoplasme, on distingue quelques inclusions rondes pour la plupart, et certainement beaucoup moins polymorphes que lors d'une infection à PI_3.

Le virus R. S. V. peut aussi être cultivé en culture d'organe en utilisant la trachée de foetus bovin. Les titres maximums sont obtenus entre 11 et 21 jours après inoculation. Cette lenteur de croissance le différencie du virus PI_3.

L'isolement du virus R. S. V. est toujours une technique très laborieuse à cause des surinfections bactériennes et de la réponse immunologique rapide de l'animal. Mais surtout, il faut insister sur la fragilité de ce virus et la condition expresse que le prélèvement soit immédiatement ensemencé sur cultures cellulaires, ou à défaut, plongé dans l'azote liquide jusqu'au moment de son ensemencement.

Cependant, même lorsque toutes les conditions optimales sont réunies, l'E. C. P. est toujours lent à apparaître. Il faut parfois plus d'un mois pour obtenir des lésions cellulaires visibles. Tous ces facteurs font que la mise en évidence du virus R. S. V. est très aléatoire.

5) Adénovirus (7),(11),(12),(25),(88),(89),(96)

Le type 1 se développe en culture de rein de veau, de testicule de veau et de rein d'embryon de bovin comme le type 3. On peut observer un début d'effet cytopathique en culture de rein de singe. Le type 2 se développe principalement sur culture de rein de veau et le type 4 sur culture de testicule de veau.

Les types 1, 2, 3 sont hautement cytopathiques, les types 4 à 8 le sont modéremment et le type 9 l'est très peu. Dans une culture de cellules infectées par les adénovirus, certaines cellules perdent leur prolongement, deviennent globoïdes et se détachent du support. Ainsi, des cellules groupées se détachent de la paroi, tombent dans le milieu de culture où elles forment des amas irréguliers. Ce décollement produit des plages sur la nappe cellulaire. Leur décompte permet de titrer le pouvoir infectieux

du virus car le nombre de plages est fonction linéaire de la quantité de virus introduit.

Les particules virales provoquent au niveau d'une cellule, l'apparition d'une masse centrale nucléaire basophile entourée d'une zone claire qui la sépare de la membrane nucléaire. Au microscope électronique cette masse centrale apparaît comme un assemblage de particules virales qui est souvent sous forme pseudo-cristalline.

6) Réovirus (13),(25),(56),(69),(99)

Les réovirus des 3 types répliquent et produisent des effets cytopathiques dans une grande variété de cultures cellulaires (culture de rein de veau, de porc, de singe...). La température optimale est de 37°c et le pH doit être légèrement alcalin, entre 7,2 et 7,5, c'est pourquoi les milieux sont le plus souvent additionnés de bicarbonate de sodium. L'E. C. P. est plus marqué et plus précoce lorsqu'on utilise des tubes roulants au lieu de cultures stationnaires.

Etant donné que l'effet cytopathique des réovirus est lent à apparaître lorsque de petites quantités de virus sont inoculées, un passage aveugle est important si l'on souhaite éviter de manquer des spécimens positifs.

Cinq jours après inoculation, les cellules apparaissent rondes et réfractiles, plus tard elles se détachent de la paroi de verre. Si l'on effectue plusieurs passages en cellules secondaires de rein d'agneau, les changements apparaissent seulement

après 3 ou 4 jours. Lorsqu'on colore ces cellules à l'éosine on observe des inclusions cytoplasmiques éosinophiles à partir de la 18^{e} heure qui sont tout d'abord dispersées puis deviennent coalescentes et encerclent complètement le noyau en envahissant la plus grande partie du cytoplasme. Ce type d'inclusion est typique des réovirus.

7) Rhinovirus (7),(18),(21),(25),(55),(90),(93)

On utilise en général des cultures primaires de rein de veau. Le milieu de maintien doit avoir un pH de 6,8 à 7,3. Pour les cultures de rhinovirus bovins il n'y a pas de désavantage à utiliser une incubation stationnaire. On fait généralement 3 passages aveugles, avec pour chacun une incubation de 5 jours. La température optimale de réplication est de 30 à 33°c. Après plusieurs passages, l'E. C. P. est détecté au bout de 2 jours et les effets maximums apparaissent 7 jours après l'inoculation. Les cellules deviennent rondes ou ovales, réfractiles et lysées ou détachées de la paroi du tube. Après coloration à l'éosine on note des images de dégénérescence mais on ne trouve des corps d'inclusion, ni dans le noyau, ni dans le cytoplasme.

On peut aussi cultiver les rhinovirus sur culture d'organes. On utilise alors des fragments de trachée placés dans un milieu de Eagle additionné d'antibiotiques (Penicilline, streptomycine). Après le second passage en culture d'organe on peut noter un E. C. P. partiel après inoculation de ce liquide de culture sur cellules de rein de veau.

B - SERONEUTRALISATION

La séroneutralisation est utilisée soit pour l'identification du virus, soit pour la mise en évidence des anticorps capables de neutraliser la production du virus sur culture de cellules.

I . PRINCIPE (19)

La séroneutralisation est la prévention des manifestations attendues de l'infection virale par traitement du virus par le sérum avant l'inoculation de la culture :

- neutralisation de l'E. C. P.
- neutralisation colorimétrique
- réduction des plages
- neutralisation du pouvoir interférant...

La réaction la plus utilisée est la réaction de neutralisation de l'E. C. P., lorsque celui-ci existe.

II . TECHNIQUE GENERALE (19)

a) Neutralisation en tube :

1) identification du virus :

Le virus à identifier est obtenu sur culture cellulaire où il détermine un effet cytopathique caractéristique. La réaction s'opère à serum constant et virus variable. La lecture s'effectue

par examen des tubes inoculés en dénombrant ceux qui montrent un E. C. P. caractéristique. L'indice de neutralisation (IN) est représenté par le rapport :

$$I.\ N. = \frac{\text{titre du virus en présence du sérum normal}}{\text{titre du virus en présence du serum anti.}}$$

La séroneutralisation est positive lorsque : $I.\ N. \geqslant 10^2$

2) Mise en évidence des anticorps :

Le virus de référence est choisi en fonction de la rapidité et de la netteté de son E. C. P. La réaction s'opère à virus constant et sérum variable.
La séroneutralisation est jugée positive dès que le sérum pur inhibe l'E. C. P. Le titre neutralisant est déterminé par la plus haute dilution sérique qui protège une culture sur deux (ou 2 sur 3) contre l'E. C. P. du virus ; il est ordinairement exprimé par l'inverse de cette dilution.

b) Microméthode sur plaques :

Elle est basée sur le même principe que la technique en tube, mais les titres obtenus sont inférieurs. Le titre du sérum est représenté par le log décimal de l'inverse de la dilution initiale qui neutralise le virus dans 50 % des cupules.

c) Technique des plages :

Lorsque le virus mélangé en proportions convenables avec le sérum, n'est pas neutralisé, il fournit des plages dans la

couche cellulaire sous milieu nutritif gélosé. Les plages sont révélées au rouge neutre. La séroneutralisation est déclarée positive pour le mélange produisant une réduction de 50 % du nombre de plages.

III . ETUDE PARTICULIERE

a) Virus de la Rhinotrachéite infectieuse :

1) identification du virus (19),(37),(127)

L'utilisation de sérum anti I. B. R. préparé sur lapin confère à la réaction une spécificité maximum. (Lors d'emploi de sérum préparé sur bovin il est possible d'observer des neutralisations d'agents viraux différents , liées à la présence d'anticorps consécutifs à des infections inapparentes antérieures de l'animal producteur du sérum).

2) mise en évidence et titrage des anticorps neutralisants (9),(19),(27),(58),(81),(103),(127)

Les anticorps neutralisants apparaissent dès la fin de la première semaine après la contamination, atteignent leur plus haut niveau à la fin de la seconde semaine, puis déclinent légèrement. Ils persistent, à des taux relativement bas, pendant de très nombreuses années.

Les titres sériques varient sensiblement selon les individus et la localisation de l'infection. Les formes génitales ne suscitent qu'une faible production d'anticorps : le titre excède alors rarement 1/10, et il arrive qu'on ne puisse les déceler. En

revanche, les formes respiratoires permettent d'observer des titres atteignant 1/64 à 1/128.
Une réaction de neutralisation combinant la technique colorimétrique et l'E. C. P. en culture cellulaire a été mise au point pour déceler les anticorps neutralisant le virus de la R. T. I. (45). On évalue la réaction en recherchant l'E. C. P. au microscope à statif inversé et en examinant la couleur du milieu de culture. Les résultats montrent une bonne corrélation entre les tests de réaction colorée et la séroneutralisation normale. Cette méthode est simple, rapide et demande un minimum de matériel.

b) Virus de la maladie des muqueuses :

1) identification du virus (19)

La séroneutralisation n'est pas applicable à l'identification des souches non cytopathogènes, à moins de recourir à des techniques plus complexes comme l'interférence avec un virus cytopathogène, ou au test E. N. D. Elle nécessite des manipulations assez importantes et ses résultats ne peuvent être interprétés avant 4 à 5 jours.

2) mise en évidence et titrage des anticorps (19),(46),(95),(107)

Les anticorps neutralisants sont décelables à partir du 8^{e} ou 15^{e} jours après la contamination. Leur titre s'élève progressivement pendant 5 à 6 semaines, puis se stabilise pendant 3 à 4 mois pour décroître ensuite très progressivement.
Normalement, un résultat négatif implique l'absence d'anticorps neutralisants et apporte la preuve que l'animal n'a pas été antérieurement en contact avec le virus. Mais il y a une

importante exception à cette règle : les bovins atteints d'une forme grave ne possèdent pas d'anticorps neutralisants dans leur sérum, même après une évolution prolongée sur 1 à 2 mois. Les cellules secondaires de testicule de veau ont permis la mise au point d'une microméthode de séroneutralisation du virus B. V. D., qui fournit des résultats particulièrement nets (26). Cette microméthode se révèle plus sensible que la méthode en tubes avec des titres sériques supérieurs d'environ 0,5 log décimal.
On a aussi utilisé la technique de réduction des plages et la technique des disques qui consiste à déposer sur la gélose recouvrant les cultures infectées des disques imbibés de sérum provoquant ainsi l'inhibition de la destruction cellulaire sur une zône plus ou moins large autour des disques . (19).

c) Virus parainfluenzae III :

1) identification du virus (19), (59)
Le virus à identifier est obtenu sur culture de cellules rénales d'embryon de bovin. Les résultats ne pouvant être interprétés avant le 4^{e} jour, la séroneutralisation est plutôt une méthode de confirmation de l'identification initiale faite par inhibition de l'hémagglutination et inhibition de l'hémadsorption.

2) mise en évidence et titrage des anticorps (19),(59)
L'évolution des anticorps neutralisants est parallèle à celle des anticorps inhibant l'hémagglutination. Ils apparaissent vers le 7^{e} jour, culminent vers la 3^{e} semaine, diminuent ensuite mais sont encore décelables durant 6 à 8 mois. L'interprétation

des résultats de la séroneutralisation est donc superposable à celle des résultats de l'I. H. A. C'est pourquoi, pour PI_3, la séroneutralisation est général ement mise en oeuvre qu'à titre de confirmation de l'I. H. A.

Notons que le titre des anticorps dans les sécrétions nasales est plus important que celui du sérum après exposition de l'animal à un aérosol de virus. Et, lors de réinfection l'augmentation des taux d'anticorps dans les sécrétions nasales est importante tandis qu'elle reste faible dans les sérums (64).

d) Virus respiratoire syncytial (120)

Les anticorps neutralisants, longs à apparaître, ne permettent de poser un diagnostic que chez des animaux malades depuis un temps assez long.

Les titres ne dépassent que très rarement 1/80, c'est pourquoi on a plutôt recours à d'autres méthodes : fixation du complément, immunodiffusion et surtout immunofluorescence indirecte.

e) Adénovirus (1), (29), (50), (88)

Expérimentalement des veaux inoculés avec des adénovirus bovins types 1, 2, ou 3 développent des anticorps neutralisants en 10 à 14 jours, atteignant un niveau de 1/512. Il n'y a pas de réponse hétérotypique. Les anticorps persistent au moins 10 semaines sans aucun déclin significatif du titre. Les anticorps

dirigés contre l'antigène type spécifique neutralisent le virus en cause et le test de neutralisation est la méthode de choix pour la division des virus en sérotypes.

f) Réovirus (69)

Les anticorps neutralisants apparaissent à la fin de la première semaine pour atteindre un maximum au cours des deux semaines suivantes.

En raison de l'hétérogénéité antigénique des souches de type 2, il semble préférable d'employer plus d'un antigène pour les tests sérologiques avec ce type : autant que possible un antigène préparé à partir d'un isolement homologue serait le mieux. Ce procédé ne s'avère pas nécessaire pour les types 1 et 3.

La méthode de microneutralisation, qui permet d'utiliser de très faibles quantités de sérums, paraît plus sensible que la méthode en tube (69). Bien que moins rapide, cette méthode semble plus fidèle que l'inhibition de l'hémagglutination mais peut être aussi moins sensible, bien qu'il soit quelquefois difficile d'obtenir de bons antigènes hémagglutinants, notamment pour le réovirus type 3.

g) Rhinovirus (18), (21)

Le test de neutralisation avec des cellules de rein de veau est la méthode sérologique de choix pour l'identification des rhinovirus bovins et pour la mise en évidence des anticorps spécifiques. La plupart des autres méthodes sérologiques sont difficiles à appliquer dans la routine à cause de la quantité

de virus relativement pauvre dans les tissus de culture. On utilise aussi des cellules Hela et la sensibilité est augmentée en employant les ions Mg^{++}. La lecture est alors facilitée en utilisant un milieu au rouge de phénol qui colore les cellules saines en rouge et les cellules infectées par le virus en jaune (21).

IV . VALEUR DE LA SERONEUTRALISATION (8),(9),(37),(127)

La séroneutralisation est souvent considérée comme une méthode de référence mais sa mise en oeuvre demeure souvent très délicate. Si le temps de contact entre virus et anticorps est insuffisant, si la température n'est pas convenable, le complexe antigène-anticorps conserve son pouvoir infectieux. La neutralisation du virus, la stabilité du complexe dépend de la nature des immuno-globulines.

Actuellement, il n'existe pas de technique standardisée mais les résultats les plus reproductibles sont obtenus après incubation à 37°c pendant 24 heures du couple virus-anticorps. Si l'on modifie ces conditions, de nombreux sérums positifs ne manifestent pas leur activité et l'infection reste méconnue.

Les microméthodes souvent plus faciles à mettre en oeuvre, montrent une plus grande sensibilité que les méthodes en tubes classiques. Les raisons de cette plus grande sensibilité sont multiples :

- non dilution de l'inoculum sérum-virus,
- possibilité d'une certaine prolongation du temps de séroneutralisation,
- utilisation de cellules secondaires en phase de multiplication.

Mais, malgré leur sensibilité accrue, les tests de séroneutralisation ont un désavantage certain sur d'autres méthodes, par exemple les méthodes d'immunofluorescence, car ils exigent une main-d'oeuvre importante, des cultures cellulaires en continu, et une lecture souvent longue qui ne peut être entreprise qu'après 4 à 5 jours au moins d'incubation.

De plus, la reproductibilité de cette technique dépend à chaque fois de l'état des cultures cellulaires, de la présence ou non d'un virus latent, et de la conservation du stock de virus.

C - IMMUNOFLUORESCENCE

I . PRINCIPE (19), (103)

a) Immunofluorescence directe :

L'isothiocyanate de fluoresceine peut être conjugué aux anticorps. Ces anticorps fluorescents peuvent être des anticorps antiviraux et marquer directement les antigènes viraux dans les cellules infectées grâce à la spécificité de la réaction antigène-anticorps.

b) Immunofluorescence indirecte :

Certains anticorps peuvent se fixer sur l'antigène spécifique et former avec lui un complexe. Un sérum marqué anti- globuline du sérum de l'espèce animale examinée visualise le complexe.

II . TECHNIQUE GENERALE (19)

a) Immunofluorescence directe :

Les anticorps fluorescents sont préparés à partir de l'antisérum de référence obtenu sur lapin. Les Immunoglobulines sont couplées à l'isothiocyanate de fluoresceine. Elles doivent être ensuite titrées en présence d'un virus de référence pour déterminer la dilution optimale d'utilisation.

Après fixation les lamelles sont recouvertes de globulines marquées, puis lavées et sèchées. La lecture s'effectue par examen microscopique en lumière ultra-violette, de préférence en fond noir. La présence du virus est décelée par une fluorescence de cellules ou de groupes de cellules infectées. Le témoin positif doit présenter le même aspect, alors que le témoin négatif ne doit pas réveler de fluorescence.

b) Immunofluorescence indirecte :

Les sérums à examiner sont inactivés puis dilués et mis en contact avec les lamelles comme précédemment. Après avoir été lavées, les lamelles sont recouvertes d'antiglobulines marquées.

La réaction est positive lorsque l'on note l'existence d'une fluorescence comparable au témoin positif.

c) Le titrage des anticorps :

Il existe une corrélation entre la quantité de virus ensemencé et le nombre de foyers fluorescents.

Ainsi, disposant d'un stock de lamelles, on peut effectuer le titrage des anticorps par la méthode indirecte. Mais cette technique est relativement délicate car la détermination de la dilution limite est très subjective ; en effet, elle tient compte de l'intensité de la fluorescence et du nombre de cellules marquées.

III . ETUDE PARTICULIERE

a) Virus de la Rhinotrachéite infectieuse :

1) la mise en évidence et l'identification du virus (19),(37),(71),(86),(102),(111)

La mise en évidence des antigènes viraux dans les tissus, est très délicate à cause des fluorescences non spécifiques. Il vaut mieux mettre le virus en culture, les antigènes viraux apparaissant alors dans la 24^{e} ou la 36^{e} heure. On utilise en général la technique directe.

La présence du virus est indiquée par une fluorescence jaune-verdâtre de groupes de cellules formant des foyers de taille variable.

L'apparition de la fluorescence au niveau de la cellule se fait en trois étapes :

- fluorescence nucléaire,
- fluorescence diffuse à toute la cellule,
- dégénérescence des cellules qui deviennent intensément fluorescentes.

2) mise en évidence des anticorps (19),(71),(103)

La technique d'immunofluorescence indirecte est particulièrement spécifique et il n'y a pas de réaction croisée avec les autres virus Herpès. Elle est aussi très rapide puisqu'elle peut se réaliser en 4 heures. Mais la réaction manque parfois

de sensibilité car, pour éviter les fluorescences non spécifiques, il faut diluer le sérum au moins un 1/5.

Les titres obtenus s'élèvent rapidement pendant la seconde semaine suivant l'apparition des troubles cliniques et persistent au moins pendant un laps de temps équivalent à celui obtenu par la séroneutralisation.

b) Virus de la maladie des muqueuses :

L'immunofluorescence est une technique de choix pour l'étude de la maladie des muqueuses. Elle supplante ou complète les autres méthodes en visualisant de façon précoce le virus en culture de cellules rénales bovines, et en mettant en évidence très rapidement les anticorps des animaux infectés.

1) recherche du virus (19),(30),(71)

Au microscope, à faible grossissement, la fluorescence apparaît jaune-verdâtre, irrégulièrement dispersée dans une nappe cellulaire à peine visible. La fluorescence est cytoplasmique, elle débute en région périnucléaire, puis s'étend à tout le cytoplasme.

A l'immersion, on observe 3 types de fluorescence selon la souche examinée : (125)

- fluorescence uniforme du cytoplasme (sauf au niveau des vacuoles) (souche C 24 V - NADL),
- fluorescence ponctuée (souche R_{125}),
- fluorescence intermédiaire (souche I_{100}).

2) recherche des anticorps (19),(30),(41)

Les anticorps apparaissent entre le 3^{e} et le 10^{e} jour, puis augmentent progressivement et atteignent un taux élevé après 1 à 4 mois.

Les souches cytopathogènes et non cytopathogènes produisent une réaction croisée mais la fluorescence est plus intense dans le système homologue.

c) Virus parainfluenzae III (10),(71),(86),(102), (114),(115)

L'immunofluorescence peut être utilisée pour la recherche et le titrage des anticorps en faisant appel à la technique indirecte, mais elle est surtout intéressante pour la mise en évidence et l'identification du virus.

Cette identification peut être réalisée directement dans les cellules prélevées par écouvillonnage ou dans les tissus pulmonaires prélevés sur le cadavre ; mais elle se révèle très délicate en raison des fluorescences non spécifiques souvent très importantes. Aussi vaut-il mieux opérer sur le virus isolé en culture cellulaire ou en culture d'organe.

En culture cellulaire, la présence du virus est décelée par une fluorescence des cellules ou des groupes de cellules infectées, irrégulièrement dispersée dans la nappe cellulaire. Elle se situe dans le cytoplasme, les noyaux n'étant pas colorés.

Dans les cultures trachéales et nasales, les cellules fluorescentes sont observées 48 heures après inoculation. La fluorescence est cytoplasmique, granulaire ou diffuse. Trois à quatre jours après l'infection, on observe une augmentation du nombre des cellules positives : toute la lignée épithéliale est fluorescente. Au délà du 6^{e} jour, le nombre des cellules fluorescentes diminue et il y a desquamation.

d) Virus respiratoire syncytial :

1) mise en évidence du virus (44),(71),(94),(111),(122)
La mise en évidence de l'antigène viral peut se faire directement à partir de cultures lymphocytaires bovines traitées à la phytohémagglutinine (Gilette, Olson), ou à partir de coupes ultrafines de poumons. On décèle alors des plages fluorescentes où le cytoplasme des cellules atteintes apparaît parsemé de très nombreux grains brillants.

Mais une technique dérivée de l'immunofluorescence indirecte a été mise au point pour la mise en évidence de l'antigène viral R. S. V. : le test de Neutralisation de l'immunofluorescence indirecte (N. I. F. I.).(121)

Le principe est le suivant : les cellules contenant l'antigène de référence sont fixées sur une lame porte-objet. Le sérum de référence est mis en contact avec l'antigène du prélèvement, les anticorps qui n'auront pas formé de complexe seront ensuite mis en présence de l'antigène de référence

et révélés par des antiglobulines marquées. Ainsi, si la fluorescence n'apparaît pas, on peut en déduire que les anticorps de référence ont été captés par les antigènes du prélèvement et le résultat est positif. Si, au contraire, une fluorescence caractéristique apparaît, elle signifie que le prélèvement examiné ne contient pas d'antigène spécifique et le résultat est négatif. Le titre de l'antigène est déterminé par l'inverse de la dilution limite.

Le test N. I. F. I. est sensible et permet de déceler la présence virale plus précocément qu'avec les autres tests. Il supplante l'immunofluorescence directe lorsqu'une fluorescence anormale empêche de conclure avec certitude. Il donne une réponse quantitative et permet de préciser le moment où la concentration virale est maximale. Il est rapide et permet un diagnostic en moins de 30 heures. En outre, la lecture du test est facile et les réactions aspécifiques sont rares, enfin il est parfaitement reproductible.

2) mise en évidence des anticorps (83),(120),(122)
L'immunofluorescence indirecte appliquée au virus R. S. V. est une méthode sensible. La préparation à l'avance des lames peut permettre un examen rapide et révéler, par des montées significatives des titres d'anticorps, une infection virale au sein d'un effectif.

Les titres obtenus par cette méthode sont supérieurs à ceux obtenus par la fixation du complément.

e) Adénovirus (96),(105)

L'existence de nombreux types antigéniques d'adénovirus rend l'identification de ce groupe de virus en culture cellulaire à la fois difficile et longue. Aussi a-t-on préparé un antisérum de groupe permettant de détecter les différents types d'adénovirus (96). Cette méthode offre ainsi une économie considérable de temps et de réactifs.

Les types 1, 2, et 3 présentent une fluorescence nucléaire caractéristique 18 heures après inoculation des cultures. 36 heures après, on observe une intense fluorescence dans les noyaux et quelques granules fluorescents dans le cytoplasme des cellules infectées. 48 heures après, il y a perte de l'intégrité cellulaire.

Pour les types 4, 5 et 6, la fluorescence nucléaire spécifique apparaît en 48 heures.

f) Identification des virus à l'aide d'anticorps fluorescents préparés à partir d'antisérums multivalents (71), (102)

Généralement on prépare un stock d'anticorps fluorescents à partir d'un sérum contenant des anticorps contre un seul virus. Si plusieurs agents sont suspectés il faut faire de nombreux tests. Mais on peut préparer des conjugués multivalents à partir de sérum d'animaux hyperimmunisés avec plusieurs virus,

ce qui a été réalisé pour les virus I. B. R., PI_3, R. S. V. et B. V. D.

Le diagnostic différentiel est basé sur la localisation et la forme de la fluorescence dans les cellules qui sont particulières à chacun des virus et sur leurs effets cytopathiques.

Le plus grand avantage de cette méthode est le gain de temps et de matériel. De plus, les infections multiples peuvent être détectées à l'aide d'un test unique. Cependant la lecture est parfois délicate et il est important d'examiner les cultures 16 à 18 heures après l'infection, l'interprétation étant difficile après ce laps de temps.

IV . VALEUR DE L'IMMUNOFLUORESCENCE (8),(10),(19),(30),(87) (101),(103),(124),(127)

a) Pour la mise en évidence du virus :

L'immunofluorescence donne des résultats objectifs car dans le cas d'infections mixtes elle permet de déceler dans les cellules des tissus les antigènes de plusieurs virus. En outre, elle se caractérise par un haut niveau de spécifité en général, une grande sensibilité et une grande rapidité d'examen. Cependant les résultats obtenus sont toujours fonction de la qualité du sérum utilisé, son marquage est délicat et exige une grande attention. La réussite du diagnostic dépend de l'existence de globulines fluorescentes hautement spécifiques.

b) Pour la mise en évidence des anticorps :

L'immunofluorescence est à peu près aussi sensible que la séro-neutralisation. Elle présente des avantages certains :

- avec cette technique les travaux de cultures cellulaires sont minimisés par la préparation de centaines de lamelles qui peuvent être conservées des mois à -30°c. De cette façon les résultats obtenus sont parfaitement reproductibles.

- les anticorps décelés par cette méthode sont précoces et atteignent des titres très intéressants.

Mais, la méthode se révèle plus qualitative que quantitative, l'affaiblissement de la fluorescence au fur et à mesure de la dilution du sérum étant progressive, il est parfois délicat de déterminer la dilution maximale encore fluorescente.

D - FIXATION DU COMPLEMENT

La fixation du complément peut être mise en oeuvre pour l'identification du virus mais en pratique, elle est surtout utilisée pour la mise en évidence et le titrage des anticorps chez un animal suspect.

I . PRINCIPE (19), (103)

Certains anticorps, en présence de l'antigène correspondant, forment un complexe stable avec le complément. Le test de fixation du complément, simple à réaliser, permet la visualisation du complexe antigène-complément-anticorps par le blocage du complément responsable de la lyse des hématies dans un système hémolytique.

II . TECHNIQUE GENERALE (19), (103)

L'antigène fixateur du complément est constitué par le surnageant d'une culture cellulaire lysée par l'action du virus. Il est titré en présence d'un sérum de référence selon la méthode dite de l'échiquier complet avec des dilutions croissantes d'antigènes et d'anticorps.

La plus forte dilution d'antigènes permettant la fixation du complément en présence de la plus forte dilution du sérum de

référence correspond à l'unité antigénique ; on utilise dans la réaction 2 unités antigéniques.

La révélation de la fixation du complément est faite par adjonction du mélange globules rouges de monton-sérum hémolytique antiglobules rouges de mouton.

L'absence d'hémolyse est le témoin d'une fixation du complément par le premier système antigène-anticorps. Le titre du sérum correspond à l'inverse de la plus forte dilution sérique donnant une absence totale d'hémolyse, ou, au maximum 25 % d'hémolyse.

III . ETUDE PARTICULIERE

a) Virus de la Rhinotrachéite infectieuse (103),(127)

Dès le 4^{e} jour, le taux des anticorps s'élève pour atteindre son apogée vers le 15^{e} jour. Ensuite les titres diminuent progressivement pour disparaître quasi totalement après le 2^{e} mois. Les titres obtenus par chaque laboratoire varient en fonction de variantes incontrolables comme la sensibilité du système hémolytique, la qualité du sérum frais de veau adjoint au complément, le titre de l'antigène.

La comparaison entre la fixation du complément, la séroneutralisation et l'immunofluorescence indirecte peut permettre de savoir si la date de l'infection éventuelle est lointaine

ou récente. En effet, un sérum prélevé au 10^{e} jour sera positif en fixation du complément et en immunofluorescence indirecte, et négatif en séroneutralisation. Par contre, le même animal au 3^{e} mois ne présentera plus que des anticorps en séroneutralisation et en immunofluorescence, les anticorps fixant le complément ayant disparus.

b) Virus de la maladie des muqueuses (46), (95)

Le complexe antigène B. V. D.-anticorps exige un facteur supplémentaire pour fixer le complément du sérum de cobaye. Pour cette raison le test de fixation du complément direct modifié (M. D. C. F.) est employé pour tester les antisérums (95). Cette épreuve se révèle souvent aussi précise et moins laborieuse que l'épreuve de séroneutralisation.

Ces anticorps apparaîssent avant les anticorps neutralisants. Ils atteignent un pic 6 semaines environ après l'infection et peuvent être encore décelés 16 semaines après l'infection.

Les réponses des anticorps fixant le complément chez des veaux infectés avec des virus cytopathogènes ou non cytopathogènes sont similaires.

c) Virus parainfluenzae III (19)

Les anticorps fixant le complément peuvent être décelés vers le 6^{e} ou 7^{e} jour ; ils atteignent un taux maximum vers le 15^{e} jour, diminuent ensuite pour disparaître en 1 à 2 mois.

Ces anticorps fixant le complément sont souvent décelés par cette méthode de façon irrégulière dans le sérum des bovins infectés par le virus PI_3. L'utilisation d'autres méthodes est préférable.

d) Virus respiratoire Syncytial (83), (112)

Les anticorps fixant le complément se développent très rapidement. On peut trouver des titres de 1/32 aux premiers jours de la maladie. Le niveau d'anticorps est élevé pendant un mois, puis le titre décline progressivement. A la fin du 3^{e} mois, les anticorps ne peuvent plus être détectés.

e) Adénovirus (72), (88)

Presqu'aucun laboratoire n'emploie les 9 sérotypes bovins connus pour effectuer les tests de séroneutralisation, ce qui est nécessaire pour cette méthode spécifique, si l'on veut déceler toutes les infections bovines à adénovirus.

L'emploi des 2 antigènes mixtes dans la réaction de fixation du complément, montre rapidement si les adénovirus sont responsables de l'étiologie d'une maladie respiratoire. L'antigène mixte 1 correspond au mélange des types 1, 2, 3 et 9 ; l'antigène mixte 2 correspond aux types 4, 5, 6, 7 et 8.

En plus, chaque antigène est capable de déceler les anticorps spécifiques contre chaque type de virus inclus dans les antigènes mixtes qui possèdent un effet d'intensification à son égard.

f) Réovirus (69)

Les anticorps fixant le complément ne sont pas toujours présents dans le sérum lors d'infections à réovirus. Lorsqu'ils sont présents, ils sont apparemment spécifiques du groupe plutôt que du type et cette méthode ne permet donc pas le typage.

g) Rhinovirus (21)

Il n'y a pas de relation apparente entre les anticorps neutralisants et les anticorps fixant le complément.

Lors d'infection expérimentale, cette dissociation semble liée au fait que les virus employés dans ces tests sont constitués de particules pleines et de particules vides (non décelées en neutralisation).

IV . VALEUR DE LA FIXATION DU COMPLEMENT (19), (95)

De réalisation rapide et aisée, peu coûteuse, elle est couramment utilisée en virologie.

Cependant, c'est une réaction de sensibilité variable selon les virus ou les groupes viraux, et qui n'est fidèle qu'à condition d'utiliser des composés parfaitement titrés préalablement. De plus, dans le cas de virus respiratoires, il s'agit souvent d'une réaction de groupe plus que de type. Enfin, cette méthode ne détecte le plus souvent que les infections très récentes, mais pas les infections chroniques.

E - HEMAGGLUTINATION PASSIVE

I . PRINCIPE (19), (79)

Les antigènes fixés sur les hématies tannées et formolées sont mis au contact de dilutions successives de sérums. Les anticorps contenus dans le sérum s'unissent spécifiquement à l'antigène ; cette hémagglutination qui en résulte, apparaît sous forme d'un réseau uniforme sur le fond de la cupule.

La réaction sérologique est voisine de celle de la fixation du complément ; elle fait appel aux IgM correspondant aux antigènes de surface.

II . TECHNIQUE (19), (34), (54)

L'antigène viral est fixé sur des hématies, de mouton en général, tannées et formolées.

Les sérums non décomplémentés, sont adsorbés pendant une nuit dans une solution d'hématies puis la réaction sérologique est effectuée en microplaques.

La dernière dilution du sérum donnant lieu à une agglutination donne le titre du sérum. Un culot d'hémagglutination positive consiste en une mince couche uniforme des hématies au fond de la cupule. Le culot nétatif consiste en un amas rond de cellules sédimentées.

L'hémagglutination passive a été utilisée pour la mise en évidence des anticorps de la Rhinotrachéite infectieuse, de la maladie des muqueuses, des infections à virus PI_3, R. S. V., Adénovirus III et Réovirus III.

III . VALEUR DE L'HEMAGGLUTINATION PASSIVE (19),(27),(34),(108)

Le test d'hémagglutination passive, notamment dans le cas du virus I. B. R., comparé à la méthode de séroneutralisation, a montré un haut degré de spécificité, de sensibilité et de reproductibilité (Vengris et Maré (119)). Cependant, ces qualités sont discutées par de nombreux auteurs.

La réaction autigène-anticorps est du même ordre que celle qui intervient dans la fixation du complément, et un résultat positif peut être d'avantage interprété comme une trace d'infection récente que comme une indication d'un certain niveau d'immunité.

Dans l'ensemble, les titres obtenus en hémagglutination passive sont comparables à ceux obtenus par d'autres méthodes, mais la corrélation n'est pas linéaire : les titres bas sont les mêmes, par exemple qu'en séroneutralisation, alors que les titres élevés sont beaucoup plus forts qu'en séroneutralisation. Ceci ne facilite pas la définition du niveau de sensibilité de l'hémagglutination passive par rapport à celui d'autres méthodes.

Malgré ces restrictions, il semble que dans l'analyse de routine, cette méthode présente des avantages suffisants : elle est donc économique. Les antigènes grossièrement purifiés peuvent être préparés en quantité assez grande pour satisfaire aux besoins du laboratoire pendant d'assez longues périodes. La conservation des hématies formolées et tannées est de longue durée (plusieurs mois à basse température).

La préparation des hématies formolées tannées sensibilisées ne nécessite que quelques heures et ne demande aucune aptitude particulière.

F - INHIBITION DE L'HEMAGGLUTINATION

I . PRINCIPE (19)

Comme nous l'avons vu précédemment, certains virus (Adénovirus, Réovirus, virus PI_3) possèdent des propriétés hémagglutinantes. Mais cette propriété n'est pas spécifique et on a recours à l'inhibition de cette hémagglutination par des anticorps ; la réaction est alors spécifique. En effet, ces anticorps bloquent les agglutinines virales, empêchant ainsi leur fixation sur les hématies.

Cette méthode est utilisée aussi bien pour l'identification du virus que pour la mise en évidence des anticorps spécifiques.

II . TECHNIQUE GENERALE (19)

Le virus est récolté après 4 à 5 jours lorsque la nappe cellulaire est aux 3/4 détruite. On mélange alors la solution virale et une solution d'hématies pour titrer l'hémagglutinine. La lecture est faite après sédimentation complète des hématies. Une unité hémagglutinante représente, par définition, la plus petite quantité de virus causant l'hémagglutination complète. La réaction s'effectue ensuite avec 4 unités hémagglutinantes par unité de volume (0,2 ml).

Les sérums sont débarrassés des hétéroagglutinines par adsorption sur des hématies sensibles et des inhibiteurs non spécifiques par adsorption sur kaolin.

La lecture est effectuée lorsque la sédimentation des hématies est achevée dans le tube témoin. Le titre du sérum correspond à l'inverse de la dilution initiale du sérum la plus forte inhibant totalement l'hémagglutination.

III . ETUDE PARTICULIERE

a) Virus parainfluenzae III (14), (19), (110)

1) mise en évidence et titrage des anticorps :
Les anticorps apparaissent vers le 7^{e} ou le 8^{e} jour suivant l'infection, atteignent un titre maximum vers le 14^{e} ou 20^{e} jour, diminuent ensuite et peuvent être décelés pendant 6 à 8 mois.

Une infection récente ou contemporaine est caractérisée :

- soit par une inhibition à un titre supérieur ou égal à 10 UIHT dans le sérum tardif, le sérum précoce étant négatif ;

- soit par un titre du sérum tardif au moins 4 fois supérieur au titre du sérum précoce.

Cette technique s'est révélée valable aussi bien pour la mise en évidence des anticorps dans le sérum que dans les sécrétions nasales.

2) mise en évidence du virus PI_3 par inhibition de l'hémadsorption :

Le virus étant mis en culture cellulaire, on peut vérifier son développement dès le 2e jour puis chaque jour suivant par hémadsorption. On utilise une solution d'hématies de cobaye.

On inhibe cette hémadsorption à l'aide d'un sérum de référence. On recherche alors l'inhibition de l'hémadsorption par comparaison avec un tube témoin non traité par le sérum de référence.

b) Adénovirus (29)

La souche WBR_{50} de l'adénovirus bovin type 1 induit des anticorps inhibant l'hémagglutination de type spécifique chez les veaux infectés expérimentalement. Ces anticorps sont distincts des inhibiteurs non spécifiques normalement présents dans les sérums bovins.

Les veaux infectés par voie intranasale avec cette souche développent une réponse immunitaire rapide ; le taux maximum des anticorps est atteint en 7 jours environ. Ce niveau se maintient au moins 6 semaines.

Pour les recherches homotypiques, il y a une bonne corrélation entre l'inhibition de l'hémagglutination et la séroneutralisation. Mais, alors que le taux des anticorps inhibant l'hémagglutination reste stationnaire, il augmente en séroneutralisation.

En ce qui concerne les réactions hétérotypiques, la séroneutralisation montre plus d'anticorps hétérotypiques que l'inhibition de l'hémagglutination.

N. B. l'adsorption sur kaolin des sérums, nécessaire pour supprimer les inhibiteurs non spécifiques, entraîne une perte notable des anticorps.

c) Réovirus (33), (56), (69)

La technique d'inhibition de l'hémagglutination, utilisant des antisérums spécifiques de type 1, a été la plus employée pour l'identification et le typage des souches et c'est la méthode de choix car elle n'a pas les inconvénients des autres méthodes. Il y a seulement parfois quelques difficultés à démontrer l'agglutination des érythocytes humains pour quelques préparations de réovirus, en particulier, avec les souches de type 3. De plus, les sujets infectés par les réovirus de type 1 présentent des anticorps non seulement homotypiques mais aussi hétérotypiques contre les 2 autres types, mais à des taux plus faibles. Ce n'est pas le cas pour les infections à réovirus type 3.

Les anticorps inhibant l'hémagglutination sont détectés au 3^{e} ou 4^{e} jour et atteignent un sommet 14 jours après l'inoculation. Ce niveau persiste 15 mois. Les résultats obtenus par cette méthode sont aussi bons que ceux obtenus en séroneutralisation.

IV . VALEUR DE L'INHIBITION DE L'HEMAGGLUTINATION (19), (69)

Cette réaction a une spécificité souvent proche de celle obtenue par séroneutralisation. Sa réalisation est simple et rapide. Elle n'est pas influencée par les anticorps anti-cellules contenus dans les sérums d'animaux immunisés par des cellules de culture infectée, contrairement aux réactions de neutralisation et surtout de fixation du complément, d'hémagglutination passive et d'immunofluorescence.

C'est pourquoi, en pratique courante, on fait appel à cette réaction le plus souvent possible, c'est-à-dire chaque fois qu'on est en présence d'un virus hémagglutinant.

G - IMMUNODIFFUSION

I . PRINCIPE (19)

La structure des virus se compose de plusieurs antigènes et la spécificité immunochimique de chacun d'entre eux peut être mise en évidence par les méthodes de précipitation spécifique en milieu gélifié.

Ces méthodes consistent à faire diffuser dans un gel des solutions d'antigènes et d'anticorps et les différentes zones de précipitation obtenues correspondent à autant de différents systèmes antigène-anticorps.

II . TECHNIQUE GENERALE (19)

On utilise des boîtes de Pétri dans lesquelles sont creusés des puits de gélose, leur diamètre et leur distance respectifs sont déterminés en fonction de la puissance des immun - sérums et de la concentration de l'antigène. Le puit central est rempli avec l'antigène et les puits périphériques en alternance sont remplis d'anti-sérums de référence et de sérums à tester. Les boîtes de Pétri incubent dans une atmosphère humide à 20°c.

Les traits de précipitation peuvent apparaître en quelques heures si les quantités d'antigènes et d'anticorps précipitants sont élevées, mais certains traits ne peuvent devenir distincts qu'au bout de deux à trois jours. Ils sont examinés au dessus d'un étroit rayon de lumière oblique. Les sérums à tester sont reconnus positifs quand une ligne de précipitation se développe entre l'antigène et le sérum et fusionne avec les lignes de précipitation du sérum de référence. Si les lignes de précipitation du sérum de référence s'étendent au puit du sérum suspect, sans déviation, le sérum est reconnu négatif.

Lorsque la teneur en antigène des tissus éprouvés est faible, la ligne de précipitation est très fine et se rapproche du puit contenant l'antigène jusqu'à devenir tangente à ce puit.

III . ETUDE PARTICULIERE

a) Virus de la maladie des muqueuses (19), (48)

On utilise soit un antigène fort soit le virus de la peste porcine. De même, le sérum de référence est soit un sérum homologue soit un sérum anti-peste-porcine. La réaction s'amorce en 24-48 heures pour s'accentuer jusqu'au 4^{e} ou 5^{e} jour.

Pour les anticorps anti-B. V. D. les résultats en immunodiffusion et en séroneutralisation concordent à 100 % quand le titre en séroneutralisation est de 8 ou plus.

Le titre de l'échantillon de sérum ne peut être mesuré par immunodiffusion mais on peut en faire une estimation en utilisant le sérum d'un titre connu en séroneutralisation dans les puits appropriés et en comparant les lignes de précipitation avec celles développées avec les sérums suspects. Les résultats sont les meilleurs quand le titre des sérums en séroneutralisation varient de 8 à 64.

Il faut souligner que dans certains cas, les sérums sont cytotoxiques pour les cultures de cellules utilisées en séroneutralisation et l'immunodiffusion peut alors donner une réponse.

b) Adénovirus (2), (47)

On peut mettre en évidence des anticorps de groupe spécifiques précipitants par la réaction d'immunodiffusion. Cependant, certains sérums non précipitants sont positifs dans la réaction de neutralisation. Aussi, la technique classique d'immunodiffusion a-t-elle été modifiée pour la rendre plus sensible. On utilise un système à trois coins avec comme antigène de groupe l'adénovirus de type 1, un autre puit contient le sérum de référence, et le dernier, le sérum à tester.

La déviation de la ligne de précipitation est obtenue avec des titres 4 à 8 fois moins élevés que les titres précipitants ordinaires.

En infection expérimentale avec les adénovirus bovins de sérotype 1, les échantillons de sérum dévient la ligne de précipitation dès le 6^{e} ou 10^{e} jour après l'inoculation ; au 12^{e} jour il y a une ligne complète de précipitation.

c) Autres virus (20), (120), (126)

Le test d'immunodiffusion a été également appliqué à d'autres virus, notamment les virus I. B. R. et R. S. V. Par exemple, la précipitation en gélose permet de déceler en 24 heures la présence de l'antigène I. B. R. dans la muqueuse intestinale. Cette technique est cependant la moins sensible et son principal intérêt est de mettre en évidence une identité antigénique entre deux échantillons. Elle décèle essentiellement les animaux ayant été gravement atteints.

IV . VALEUR DE L'IMMUNODIFFUSION (19),(20),(48),(103),(126),(127)

a) Sensibilité :

Seuls méritent d'être pris en considération les résultats positifs, la méthode manque en effet de sensibilité. Le test de précipitation en gélose met en évidence un antigène uniquement lorsque celui-ci est particulièrement concentré.

b) Spécificité :

C'est la vraie méthode pour déterminer une identité, une différence ou une parenté antigénique entre deux antigènes. Cette méthode est très spécifique.

Mais dans l'ensemble, les résultats de l'immunodiffusion montrent l'intérêt de cette technique dans le diagnostic expérimental de routine ; c'est une méthode simple, aisément applicable dans n'importe quel laboratoire (contrairement à la séroneutralisation), elle est rapide d'exécution, peu onéreuse et se prête bien au testage des sérums en nombre important, enfin, son interprétation est relativement aisée. Cette méthode peut donc être proposée comme première approche dans le dépistage des infections virales, les méthodes quantitatives comme la fixation du complément ou la séroneutralisation, pouvant être appliquées par la suite, dès que l'on observe des résultats positifs.

H - CONTRE-IMMUNO-ELECTRO-OSMOPHORESE (C. I. E. O. P.)

Une amélioration de la technique précédente a été appliquée à la détection des anticorps contre le virus de la Rhinotrachéite infectieuse dans les sérums bovins. Il s'agit de la contre-immuno-électro-osmophorèse.

I . PRINCIPE (19)

Cette méthode consiste à faire migrer sous une différence de potentiel, l'antigène et l'anticorps l'un vers l'autre. Elle s'applique à des antigènes migrant vers l'anode à un certain pH, alors que les gamma-globulines, pour un même pH, vont migrer en sens contraire par électroendosmose.

II . TECHNIQUE

On recouvre une plaque de verre d'une couche d'agarose où l'on découpe des trous disposés en deux rangées parallèles. L'antigène est placé dans le puit cathodique et le sérum dans le puit anodique. Un courant est alors appliqué dans un appareil à électrophorèse.

Les résultats sont tous positifs en C. I. E. O. P. quand les sérums ont un titre supérieur à 4 en séroneutralisation.

III . VALEUR DE LA CONTRE-IMMUNO-ELECTRO-OSMOPHORESE

La C. I. E. O. P. comparée à la séroneutralisation a une sensibilité satisfaisante. Elle permet de dépister les porteurs

latents avec les mêmes chances de succès. Cette réaction offre en outre plusieurs avantages, les principaux étant la grande rapidité d'exécution, la qualité de la standardisation, le nombre important de sérums qui peuvent être examinés simultanément et la possibilité d'opérer sans respecter la stérilité.

Elle est plus rapide d'exécution et plus sensible que la réaction d'immunodiffusion double en gélose.

Cette méthode simple de détection sérologique pourrait donc remplacer, dans certains cas, les méthodes conventionnelles, plus coûteuses et plus laborieuses.

I - METHODES IMMUNOENZYMOLOGIQUES

La méthode ELISA (Titrage avec immunoadsorbant lié à une enzyme) proposée depuis une dizaine d'années pour la mise en évidence immuno-enzymologique des antigènes ou des anticorps, suscite un grand intérêt pour le diagnostic des infections virales. Elle a été adaptée au diagnostic de la Rhinotrachéite infectieuse.

I . PRINCIPE (70)

Après avoir incubé le sérum à examiner dans un tube ou sur une plaque sensibilisés par l'antigène, on ajoute l'anticorps anti-Ig marqué par une enzyme ; la quantité d'enzyme restant dans le tube ou sur la plaque après lavage permet de mesurer la quantité d'anticorps spécifiques présente dans le sérum. L'épreuve est basée sur l'insolubilisation des antigènes par adsorption passive sur une phase solide.

II . MISE EN EVIDENCE DES ANTICORPS (104)

a) Technique :

Les antigènes, adsorbés sur des plaques, sont mis en contact avec les sérums. Puis ces plaques sont lavées et recouvertes

du conjugué. Le "révélateur" est le paranitrophényl-phosphate qui change de couleur au contact de la phosphatase alcaline.

Les résultats sont exprimés en densité optique (D. O.) et un sérum sera considéré comme positif lorsqu'il fournira au 1/10 une D. O. supérieure de 0,2 à celle d'un sérum de référence négatif . Le titre sera déterminé par l'inverse de la dernière dilution de sérum qui donne une différence de 0,2 D. O. avec le pool de sérums négatifs à la même dilution.

b) Valeur du test ELISA :

La méthode est sensible, d'éxécution rapide et se prête à une automatisation aisée. De plus, contrairement à la séroneutralisation, elle n'a pas besoin des cultures cellulaires qui nécéssitent un équipement et une technologie difficiles à mettre en oeuvre.

Cependant la réaction ELISA est assez onéreuse en antigène ; en effet une boîte de Roux de cultures cellulaires infectées permet seulement la réalisation d'environ 20 titrages de sérum. Les réactions étant effectuées avec le même lot d'antigènes la technique montre une bonne reproductibilité.

+ Comparaison avec l'immunofluorescence :
L'ELISA permet plus facilement que l'immunofluorescence de rechercher en même temps dans les sérums, la présence d'anticorps contre divers agents infectieux. L'ELISA ne pourra

toutefois servir à la détection des antigènes que si l'on dispose de réactifs hautement spécifiques.

+ Comparaison avec l'hémagglutination passive :
Ces deux techniques ont en commun d'éviter le recours aux cultures cellulaires, d'être d'éxécution rapide et de permettre de traiter un grand nombre de sérums à la fois. Cependant l'ELISA est plus sensible et on obtient des titres environ dix fois plus élevés qu'en hémagglutination passive.

La technique ELISA demande un maximum de 24 heures et ce temps peut être encore réduit à quelques heures si l'antigène est fixé au préalable, la plaque étant ensuite conservée au froid.

Ces résultats préliminaires encourageants montrent que cette technique peut devenir une des grandes techniques d'avenir.

III . MISE EN EVIDENCE DU VIRUS

a) Mise en évidence du virus I. B. R. dans les liquides de l'organisme par la méthode à double anticorps (36)

Dans ce cas, on sensibilise les plaques par des anticorps spécifiques. On ajoute ensuite le liquide avec l'antigène à titrer, puis, un conjugué anticorps spécifique-péroxidase. On révèle la présence de péroxidase fixée par addition d'ortho-phenylène diamine.

Il s'agit d'une méthode hautement spécifique mais la sensibilité reste faible ; il faut des quantités importantes d'antigènes viraux. (La sensibilité serait surement nettement accrue si on employait des sérums bovins au lieu des sérums lapins utilisés ici).

b) Mise en évidence des virus PI_3 et I. B. R. dans des cultures d'organes par la péroxidase de raifort (86)

1) technique :

Les cultures d'organes infectés sont congelées puis sectionnées avant d'être recouvertes avec le conjugué anticorps-péroxidase. Le révélateur est constitué par une solution de 3,3-diaminobenzidine-tétrahydrochloride.

2) résultats :

+ Virus PI_3 :

On observe un précipité amorphe marron à marron-noir dans le cytoplasme des cellules épithéliales infectées de la muqueuse nasale et trachéale. Les noyaux sont négatifs. La réaction s'opère 48 heures après l'infection sous forme de petits granules dispersés autour du noyau, après quelques jours ces granules deviennent coalescents pour former des grappes.

+ Virus I. B. R. :

La réaction s'amorce en 16 à 18 heures et la coloration du cytoplasme est rapidement diffuse. Le noyau est négatif. Les

cellules positives sont d'abord en foyer, puis en 48 à 72 heures tout l'épithélium est positif.

3) Valeur de la technique à la péroxidase de Raifort (66)

Le temps d'apparition de la réaction est identique à celui de l'immunofluorescence.

Cependant, cette technique offre des avantages : localisation plus précise de l'antigène, durée de vie prolongée des préparations, utilisation d'un simple microscope optique.

J - MISE EN EVIDENCE DE L'IMMUNITE A MEDIATION CELLULAIRE

Les méthodes sérologiques conventionnelles utilisées pour mesurer l'immunité humorale, ignorant les phénomènes immunitaires de type cellulaire, peuvent s'avérer inappropriées à la détection des porteurs latents.

I . TEST D'HYPERSENSIBILITE RETARDEE (3), (5), (76)

La mise en évidence d'une hypersensibilité cutanée a été faite avec les virus I. B. R. et PI_3. L'injection intradermique à l'encolure de solutions d'antigène plus ou moins purifiées provoque chez les animaux infectés l'apparition d'une réaction de type tuberculinique apparaissant en 48 à 72 heures.

+ Valeur du test d'hypersensibilité retardée :
Il s'agit d'une méthode rapide, simple et fidèle de détection d'éventuels porteurs latents des virus I. B. R. et PI_3. Utilisée en combinaison avec la méthode de séroneutralisation par exemple, elle permet de différencier les anticorps transmis passivement par le colostrum des anticorps résultants d'une réelle infection.

Cependant, il s'agit d'une réaction très sensible qui présente parfois un défaut de spécificité avec les antigènes actuellement disponibles.

II . INHIBITION DE LA MIGRATION DES LEUCOCYTES (4), (49)

L'inhibition de la migration des leucocytes a été étudiée pour les virus I.B.R., PI_3 et Rhinovirus type 1.

Ces antigènes induisent la sécrétion de facteur inhibant la migration des leucocytes.

Les globules blancs et les antigènes sont mélangés et répartis dans des puits fabriqués dans la gélose. Après incubation en atmosphère humide, on fixe les préparations au glutaraldéhyde.

Les différences entre les moyennes de la surface de migration des globules blancs avec et sans antigènes viraux sont comparées suivant le test "t".

+ Valeur de la méthode :

Les résultats de ces études indiquent que les bovins développent une immunité cellulaire même lorsque la réponse en anticorps neutralisants est extrêmement faible. Contrairement aux épreuves d'hypersensibilité cutanée elle ne modifie pas le statut immunologique de l'animal.

Toutefois, la sensibilité de cette technique et son aptitude à déceler les porteurs latents, doivent encore être précisées. L'inhibition de la migration des leucocytes est par contre, un test spécifique, d'exécution rapide, aisée et peu coûteuse.

Il est commode de rassembler l'ensemble des méthodes envisagées dans cette étude sous forme d'un tableau récapitulatif où sont rappelés succintement les éventuelles particularités tenant à chaque virus ainsi que le résumé des valeurs concernant chacune des méthodes:

.../...

	SN	IF	FC	HAP	IHA	ID	CIEOP	Immuno-enzymol.	Hypers. cutanée	Inh. Migration Leucocytes
DIAGNOSTIC DIRECT										
IBR	+	+ organe				+ / −		+		
BVD	+ si ECP Interf.Homol ou END	+								
PI_3	+ organe	+			+			+		
RSV	Difficile	+ NIFI organe								
Adenov.	+	+ antiserum de groupe								
Reov.	+				+					
Rhinov.	+									
DIAGNOSTIC INDIRECT										
IBR	+ Meth.colorimetrique	+	+	+		+	+	+	+	+
BVD	+ micrometh. Meth.des Disques	+	+	+		+				
PI_3	+ Mucus Nasal	+	+ / −	+	+ Mucus Nasal				+	+
RSV	+	+	+	+		+				
Adenov.	+ typage	+	+ 2 Ag Mixtes	+	+	+ système à 3 coins				
Reov.	+ Micrometh.		+ / −	+	+					

	+		+							
Rhinov.	Meth. color									
	Méthode de référence	Très spécifique	Facile sensibilité variable	Sensibilité et spécificité discutées	Simple Rapide Spécifique	Peu sensible très spécifique non quantitative	Assez Sensible Rapide	Rapide Reproductible Sensible pour les virus	Rapide Simple Détecte les Ac porteurs latents Peu sensible Peu spécifique	Sensibilité non précisée Spécifique Rapide Facile
	Mise en oeuvre délicate	Rapide	Réaction de groupe	Signe des infections récentes	d'inhibiteurs non spécifiques)					
VALEUR	Longue	Marquage délicat	Signe une infection récente	Rapide		Simple Rapide				
		Méthode plus qualitative que quantitative		Facile						

TABLEAU RECAPITULATIF :

- Prélèvements :
  - Ecouvillonnage nasal pour le diagnostic direct et organe si précisé
  - Prise de sang pour le diagnostic indirect et mucus nasal si précisé

- Particularités : Les méthodes particulières ou modifiées sont rappelées.

C O N C L U S I O N

INTERPRETATION DES RESULTATS SEROLOGIQUES (62),(66),(77),(79),(101)

Il faut noter qu'une augmentation du titre de certains anticorps chez les animaux d'un troupeau, peut apparaître en dehors de toute manifestation clinique et ne manifester qu'une réaction collective, non pathologique, à l'implantation d'un virus non obligatoirement pathogène. Un résultat sérologique positif doit donc être interprêté avec prudence. Pour tous ceux des virus dont le rôle étiologique éventuel peut être mis en évidence par plusieurs techniques sérologiques, le choix de la ou des techniques appliquées au diagnostic indirect devrait reposer non pas sur la plus ou moins grande aisance d'exécution, mais sur les possibilités réelles d'interprétation des résultats qu'elles fournissent.

De plus, la localisation des agents infectieux au niveau de la muqueuse respiratoire, entraîne le plus souvent une réponse locale qui ne retentit pas immédiatement sur le taux d'anticorps sériques. Les examens sérologiques, pour s'adapter à la nature de ces maladies locales, devraient porter sur des produits faciles à atteindre, tels que le mucus nasal. Cependant, l'hétérogénéité de ce produit limite son emploi aux diagnostics isolés et ne permet pas de l'utiliser lors d'enquêtes extensives.

Enfin, les séroconvertions, si elles peuvent signer la présence d'un virus, n'indiquent pas sa participation à la pathologie observée, d'où l'importance de comparer les résultats séro-

logiques, virologiques, bactériologiques, cliniques et épidémiologiques, ce qui constitue une difficulté importante.

L'objectif de cette étude a été de rapporter les différentes techniques proposées par les auteurs, en insistant surtout sur leurs valeurs comparées et sur les possibilités d'interprétation. Nous espérons avoir fourni aux étudiants une initiation au diagnostic de laboratoire, aux praticiens l'éventail des possibilitées offertes à condition de fournir des prélèvements adaptés, et à l'homme de laboratoire une synthèse des travaux effectués accompagnée des références bibliographiques permettant d'approfondir chaque technique.

Vu : Le Professeur de l'Ecole Vétérinaire
rapporteur

Professeur BEZILLE

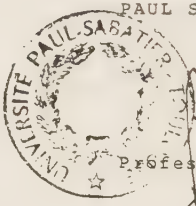
Vu : Le Directeur de l'Ecole
Vétérinaire

Professeur R. LAUTIE

Vu : Le Président de la Thèse

Professeur CARLES

VU ET PERMIS D'IMPRIMER
Toulouse, le 27.4.1982
LE PRESIDENT DE L'UNIVERSITE
PAUL SABATIER



Professeur D. BANCEL

B I B L I O G R A P H I E

(1).
Adair (B. M.), Mc Ferran (J. B.) - Comparative serological studies with mammalian adenoviruses. Archives of Virology , 1976,51,319-325.

(2).
Afshar (A.) The occurence of precipitating antibodies to bovine adenovirus in sera of farm animal and man in Iran. Vet. Rec. 1969, 84, 571-572.

(3).
Aguilar - Setién (A.), Pastoret (P. P.), Jetteur (P.), Burtonboy (G.), Schoenaers (F.) - Excrétion du virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (IBR, Bovid Herpes virus 1) après injection de déxaméthasone, chez un bovin réagissant au test d'hypersensibilité retardée, mais dépourvu d'anticorps neutralisant ce virus. Ann. Med. Vet, 1979, 123, p 93-101.

(4).
Aguilar-Setién (A.), Pastoret (P. P.), Michaux (C.), Burtonboy (G.), Jetteur (P.), Schoenaers (F.) - Inhibition, en présence de l'antigène homologue, de la migration des leucocytes circulants provenant de bovins inoculés expérimentalement avec le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (Bovid Herpes virus 1, BHV 1) - Ann. Med. Vet. 1979, 123, 249-255.

(5).
Aguilar-Setién (A.), Pastoret (P. P.), Burtonboy (G.), Schoenaers (F.) - Test d'hypersensibilité retardée au virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (Bovid Herpes virus 1) - Ann. Med. Vet. 1978, 122, 193-199.

(6).
Aguilar-Setién (A.), Dagenais (L.), Pastoret (P. P.) - Détection, chez les Bovins, des anticorps contre le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (Bovid Herpes virus 1, IBR) par une technique de contre-immuno-électro-osmophorèse (C. I. E. O. P.)- Ann. Med. Vet. 1980,124, 137-142.

(7).
Adrewes, Pereira - Viruses of Vertebrates
London : Bailliere Tindall, Third Edition, 1972, 451 p.

(8).
Assaf (R.), Marsolais (G.), Marois (P.), Payment (P.), Correlation between the serum Neutralization test and the indirect immunofluorescence test for the detection of specific antibodies to infections bovine Rhinotracheitis virus.
Can. J. com. Med. 1975, 39(1), 224-226.

(9).
Asso (J.). Problèmes posés par l'existence de la Rhinotrachéite bovine en France. Bull. de la société Vet. pratique 1976, 105-111.

(10).
Baczynski (Z.), Majewska (M.), Skulmowska - Kryskkowska (D.) Karpinski (S.) - Isolation and identification of Parainfluenza virus and infecticus bovin rhinotrachéitis virus from nasal swabs of diseased cattle. Bull. Vet. Insti. Pulawy 1974, vol 18, 1-2, 21-27.

(11).
Bartha (A.) - Proposal for subgrouping of Bovine adenoviruses. Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae 1969, 19, 318-321.

(12).
Bartha (A.), Csontos (L.). Isolation of Bovine Adenoviruses from tissue cultures of calf testicules - Acta Veterinaria Hungaricae 1969, 19, 323-325.

(13).
Belák (S.), Palfi(V.), Isolation of reovirus type 1 from Lambs showing respiratory and intestinal symptoms.
Archiv für die gesamte Virus forschung 1974, 44, 177-183.

(14).
Bernhardt (D.), Bengelsdorff (H. J.). Ein Beitrag zum Nachweis von Parainfluenza-3 virus antikörpern aus Serum und Nasensekret von kölbern und Rindern unter besonderer berücksichtigung der haemagglutinationshemmenden Antikörper.
Zbl. Vet. Med. B. 1973, 20, 102-110.

(15).
Betts (A. O.), Edington (N.), Jennings (A. R.), Reed (S. E.). Studies on a Rhinovirus (EC_{11}) derived from a calf.
II. Disease in calves. J. Comp. Path. 1971, Vol 81, 41-48.

(16).
Bienfet (V.) 9^{e} congrès international sur les maladies du bétail. Paris, 1976 tome 3 - Rapport de synthèse. Edité par les laboratoires Boehringer Ingelheim et la société française de Buiatrie.

(17).
Blood (D. C.), Henderson (J. A.), Médecine Vétérinaire Vigot Frères éditeurs, 2e édition, 1976, 1100 p.

(18).
Bögel (K.). Bovine rhinoviruses. J. A. V. M. A., 1968,152, 6, 780-783.

(19).
Bricout (F.), Joubert (L.), Huraux (J. M.). Diagnostic séro-immunologique des viroses humaines et animales. Paris, Maloine SA Editeur, 1974, 581p.

(20).
Charton (A.),Faye (P.), Le Layec (C.). Application de la méthod d'immunodiffusion en gélose au diagnostic expérimental d'infections à Herpèsvirus bovin chez les bovins (Rhinotrachéite infectieuse chez le veau, Balanoposthite chez le taureau) - Bulletin de l'académie Vétérinaire 1975, 48, 71-76.

(21).
Chaillon (J. P.). Les Rhinovirus animaux - Thèse Vétérinaire Alfort 1969, 55.

(22).
Coman (J.) Contributions au diagnostic séro-immunologique dans les complexes des viroses entéro-pulmonaires des bovins. Archiva Veterinaria 1971, 8, 62-69.

(23).
Couder (M.), Fedida (M.), Dannacher (G.), Perrin (B.), Perrin (M.) Martel (J. L.). Etude expérimentale des pneumopathies virales des jeunes bovins - Bull. De l'office international des Epizooties 1977, 88, 27-39.

(24).
Couder (M.), Perrin (M.), Moussa (A.), Fedida (M.), Dannacher (G.). Les pneumopathies virales des bovins en France : situation épidémiologique actuelle. XI international congress on diseases of cattle. Tel. Aviv. 20-23 october 1980. I. scientific editor. E. Mayer. p 350-354.

(25).
Crucière (L.), Plateau (E.), Remond (M.). Orientation du diagnostic virologique par l'étude de l'E. C. P. et des inclusions cellulaires au laboratoire central de recherches vétérinaires. Bull. Acad. Vet. de France, 1979, 52, 591-598.

(26).
Dannacher (G.), Martel (J. L.). Le titrage des anticorps contre le virus de la maladie des muqueuses par une microméthode de séroneutralisation. Rec. Med. Vet. 1978, 154, 31-37.

(27).
Dannacher (G.), Perrin (M. et B.). Utilisation d'une technique d'HAP pour la détection des anticorps contre le virus de la Rhinotrachéite bovine infectieuse. Rec. Med. Vet. 1979, 155, 633-637.

(28).
Dannacher (G.), Fedida (M.), Moussa (A.). La rhinotrachéite bovine infectieuse. Sa place dans la pathologie respiratoire. Rev. Med. Vet. 1979, 131, 5, 359-368.

(29).
Darbyshire (J. M.). Bovine adenoviruses. J. A. V. M. A., 1968, 152 (6), 786-792.

(30).
Devic (M.). Contribution à l'étude de l'immunofluorescence dans la maladie des muqueuses des bovins. Thèse Vétérinaire, Toulouse, 1971, n° 21.

(31).
Ditchfield (J.), Doane (F. W.) - the properties and classification of bovine viral diarrhea virus. Can. J. Comp. Med. Sci. 1964, 28, 148-152.

(32).
Dunne (M. W.), Whei Jun Lin, Huang (L. M.) - Bovine adenoviruses an attempt at serologic and pathogenic characterization. J. A. V. M. A., 1973, 163 (10), 1 190.

(33).
Durham (P. J. K.), Burgess (G. W.), A limited serological survey of North Island cattle for antibody to a number of endemic viruses. New Zealand Veterinary Journal, 1977, 25, 132-133.

(34).
Espinasse (J.), le Layec (C.), Faye (P.). Hemagglutination passive : application au diagnostic sérologique des affections respiratoires virales des jeunes bovins. Rec. Med. Vet. 1978, 154 (3), 227-232.

(35).
Espinasse (J.), Pathologie respiratoire des jeunes bovins en élevage intensif : causes et contrôle. Bull. Des G. T. V., 1974, Mai, 1-9.

(36).
Faye (P.), Espinasse (J.), Le Layec (Cl.), L'Haridon (R.). Essai de détection, dans les sécrétions nasales des bovins, de l'herpesvirus de la rhinotrachéite infectieuse, par application d'une technique immunoenzymologique. Bull. Acad. Vet. de France, 1979, 52, 507-512.

(37).
Faye (P.). Diagnostic expérimental, dans les infections bovines à virus IBR/IPV (Rhinotrachéite infectieuse, infections génitales externes, avortements, etc...) : Aspects actuels. Bull. de la société Vet. pratique, 1976, 337-348.

(38).
Fedida (M.), Dannacher (G.), Perrin (M.), Coudert (M.), Martel (J.L). La rhinotrachéite bovine infectieuse en France : situation épidémiologique et vaccination à l'aide de vaccins inactivés. Bull. de l'office international des épizooties, 1977, 88, 41-56.

(39).
Fedida (M.), Perrin (M.), Dannacher (G.), Coudert (M.), Martel (J
Les affections respiratoires virales des bovins : résultats de 2 ans d'examens de laboratoire. Bull. off. int. Epiz., 1976, 85 (1-2), 33-45.

(40).
Fernelius (A. L.), Lambert (G.), Booth (G. D.), Bovine viral diarrhea virus. Host cell interactions : serotypes and their relationship to biotypes by cross-neutralization Am. J. Vet. Res. 1971, 32 (2), 229-236.

(41).
Fernelius (A. L.), Non cytopathogenic Bovine viral diarrhea Viruses detected and titrated by immunofluorescence.
Can. J. Comp. Med. Vet. Sci., 1964, 28, 121-126.

(42).
Frank (G. M.), Marshall (R. G.). Parainfluenza-3 virus infection of cattle. J. A. V. M. A., 1973, 163 (7), 858-860.

(43).
Gilbert (Y.). La rhinotrachéite infectieuse des bovins - Bull. des GTV, 1975, mars, 1-12.

(44).
Gillette (G.), Olson (C.). Demonstration of bovine syncytial viral antigen in bovine lymphocyte cultures by immunofluorescence Am. J. Vet. Res. , 1973, 34 (4), 493-495.

(45).
Greig (A. S.). A serum neutralization test for infectious bovine rhinotracheitis based on colour reaction and cytopathic effects in cell culture. Can. J. Comp. Med. 1969, 33, 85-88;

(46).
Gutekunst (D. E.), Malmquist (W. A.). Complement - fixing and neutralizing antibody response to bovine viral diarrhea and Hog cholera antigens. Can. J. Comp. Med. Vet. Sci. 1964, 28, 19-23.

(47).
Haralambiev (H.), Motovsky (A.), Mansheva (N.), Arnaudov (N.), Enhancement of the sensitivity of the immunodiffusion réaction in the detection of antibody against bovine adenovirus. Archiv für Experimentelle Veterinärmedizin 1973, 27, 925-928.

(48).
Hopkinson (M. F.), Hart (L. T.), Seger (C. L.), Larson (A. D.), Fulton (R. W.). An immunodiffusion test for detection of bovine viral diarrhea virus antibodies in bovin serum. Am. J. Vet. Res. 1979, 40 (8), 1189-1191.

(49).
Hussain (A.), Mohanty (S. B.). Cell mediated immunity to bovine rhinovirus type 1 in calves. Archives of virology 1979, 59, 17-24.

(50).
Ide (P. R.), Tomson (R. G.), Ditchfield (W. J. B.) Experimental adenovirus infection in calves. Can. J. Comp. Med., 1969, 33, 1-9.

(51).
Ide (P. R.), Darbyshire (J. M.). Studies with a Rhinovirus of bovine origine. II. Some physical and chemical properties of strain RS 3x. Arch. Ges Virusf., 1972, 36, 177-188.

(52).
Ide (P. R.), Darbyshire (J. M.), Studies with a rhinovirus of bovine origine. III. The pathogenesis and pathology of infection with strain RS3x in calves. Arch. Ges. Virusf. 1972, 36, 335-342.

(53).
Inaba (Y.), Omori (T.), Kumagai (T.). Detection and measurement of non-cytopathogenic strains of virus diarrhea of cattle by END Methode. Arch. Ges. Virusf. 1963,13, 425-429.

(54).
James, Whitman, Hetrick. An indirect hemagglutination test for detecting antibody to infectious bovine rhinotrachéitis virus. The cornell Veterinarian, 1965, 55(4), 613-622.

(55).
Kurogi (H.), Inaba (Y.), Goto (Y.), Takahashi (A.), Sato (K.), Omori (T.), Matamoto (M.). Isolation of rhinovirus from cattle in outbreaks of acute respiratory disease.
Archiv für die gesamte virus forschung 1974, 44, 215-226.

(56).
Lamont (P. M.). Reoviruses. J. A. V. M. A. 1968, 152 (6), 807-813.

(57).
Lehmkuhl (M. D.), Gough (P.M.), Reed (D. E.). Characterization and identification of B. R. S. V. isolated from young calves. Am. J. Vet. Res., 1979, 40 (1), 124-126.

(58).
Le Jan (C.), Haridon (R.), Asso (J.). Application au diagnostic précoce de la mise en évidence d'anticorps locaux neutralisant le virus de la Rhinotrachéite infectieuse bovine chez le veau. Bull. de l'office international des épizooties 1977, 88, 57-60.

(59).
Le Jan (C.), Contribution à l'étude des pneumonies enzootiques des bovins. Thèse, Toulouse 1974 n° 6608.

(60).
Manson (D. E.). Naturally occuring infection of calves with a bovine adenovirus. Am. J. Vet. Res. 1973, 34 (5), 623-629.

(61).
Malmquist (W. A.), Bovine viral diarrhea - Mucosal disease : Etiology, pathogenesis, and applied immunity. J. A. V. M. A. 1968, 152 (6), 763-768.

(62).
Maire (C.), Labadie (J. P.), Renault (L.) Enquête sur les maladies respiratoires d'origine virale du veau de boucherie. Relations entre sérologie et signes cliniques. XI international congress on diseases of cattle. Tel - Aviv 20-23 october 1980. I. Scientific editor. E. Mayer p 343-349.

(63).
Marian (P. D.), Horzinek (C.). Togaviruses. Am. Med. Vet., 1978, 122, 293-299.

(64).
Marshall (R. G.), Frank (B. S. G.). Neutralizing antibody in serum and nasal secretion of calves exposed to parainfluenza-3 virus. Am. J. Vet. Res. 1971, 22 (11), 1699-1706.

(65).
Martel (J. L.), Dannacher (G.) Perrin (M.), Couder (M.), Fedida (M.). Les pneumopathies virales des bovins en France : bilan de 4 années d'examens sérologiques. Bull de l'office international des épizooties, 1977, 88, 17-25.

(66).
Martin (W. B.). Respiratory diseases in cattle. A seminar in the EEC. Programme of coordination of research on beff producti held at Edinburgh. November 8-10, 1977.

(67).
Matamoto (M.), Inada (Y.), Kurogi (M.), Sato (K.) Omori (J.) Goto (Y.), Hirose (O.). Bovine respiratory syncytial virus ; host range in laboratory animals and cell cultures. Arch. Ges. Virusf. 1974, 44,280-290.

(68).
Mattson (D. E.). Adenovirus infection in cattle J. A. V. M. A., 1973, 163 (7), 894-896.

(69).
Maugard (J. P.). Les réovirus animaux. Thèse, Alfort 1970 n° 121

(70).
Memorandum : Le titrage avec immuno adsobant lié à une enzyme (ELISA). Bulletin of the world health organization, 1977, 55 (5) 557-568.

(71).
Mengeling (W. L.), Van der Maaten (M. J.). Identification of selected animal viruses with fluorescent antibody prepared from multivalent antiserums. Am. J. Vet. Res. 1971, 32 (11), 1825-1833.

(72).
Messner (A.), Minaidy (B.), Bürki (F.). Bovine adenoviruses IV. Two mixed antigens for routine serodiagnosis by complement fixation reaction. Comp. Immun. Microbiol. infect. Dis., Vol. 1, 351-359.

(73).
Mohanty (S. B.). New Herpes viral and rhinoviral respiratory infections. J. A. V. M. A., 1973, 163(7), 855-857.

(74).
Mohanty (S. B.) Bovine respiratory viruses. Advances in Veterinary science and comparative medicine, 1978, 22, 83-109.

(75).
Moine (J. P.) Les myxovirus des animaux, Thèse. Alfort 1967.

(76).
Morein (B.) Moreno-Lopez (J.). Skin hypersensitivity to para-influenza 3 virus in cattle. Zbl. Vet. Med. B, 1973, 20, 540-546.

(77).
Mornet (P.), Espinasse (J.). Le veau. Maloine Editeur, Paris, 1977, 607 p.

(78).
Nwude (N.) Paulsen (J.). Untersuchunger an fetalen rinder haut-zellinien. Zbl. Vet. Med. B, 1973, 20, 522-532.

(79).Parard. (R.). Affections respiratoires virales des veaux de boucherie en élevage industriel. Thèse 1980.

(80).
Pastoret (P. P.), Aguilar - Setien (A. A.), Schoenaers (F.).

Le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (BHV 1) Ann. Med. Vet 1978, 122, 371-391.

(81).
Pastoret (P. P.), Burtonboy (G.), Aguilar-Setién (A.), Schoenaer (F) - Mesure de l'excrétion du virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine après inoculation expérimentale. Ann. Med. Vet, 1978, 122, 441-447.

(82).
Peculier (J. N.) La maladie des muqueuses : une enzootie en Vendée. Thèse, Toulouse, 1973, n° 15.

(83).
Perrin (B.), Dannacher (G.), Solsona (M.). Mise en évidence des anticorps contre le virus respiratoire syncytial chez les bovins français. Rec. Med. Vet. 1979, 155, 465-471.

(84).
Persechino (A.) Isolation of rhinoviruses from calves and their characterization. Acta Medica Veterinaria 1974, 20 (516) 33-358.

(85).
Phillip (J. I. M.), Darbyshire (J. H.). Respiratory viruses of cattle. Advances in veterinary science and comparative medicine 1971, 15, 159-200.

(86).
Pospisil (Z.), Machatkova (M.), Rozkosny (V.), Mensik (J.) Demonstration of Parainfluenza 3 virus and infectious bovine rhinotracheitis virus in bovine foetal organ cultures, by immunofluorescence and horseradish peroxidase technique. Acta Vet. BRNO, 1975, 44, 189-195.

(87).
Potyieter (L. N. D.), Aldridge (P. L.). Use of the indirect fluorescent antibody test in detection of bovine RSV antibodies in bovine serum. Am. J. Vet. Res, 1977, 38 (9), 1341-1343.

(88).
Quinart (P. M.) - Les adénovirus animaux. Thèse Alfort 1968.

(89).
Reed (D. E.), Wheeler (J. G.), Lupton (M. W.). Isolation of bovine adenovirus type 7 from calves with pneumonia and enteritis. Am. J. Vet. Res. 1978, 39 (12), 1968-1971.

(90).
Reed (S. E.), Tyrrell (D. A.), Betts (A. O.), Watt (R. G.). Studies of rhinovirus (EC_{11} derived from a calf I. Isolation in calf tracheal organ cultures and characterization of the virus. J. comp. Path. 1971, 81, 33-40.

(91).
Röhrer (M.) Traité des maladies à virus des animaux. Vigot Frères éditeurs, Paris, 1969.

(92).
Rosenberger (G.). Examen clinique des bovins. Les éditions du point vétérinaire, 1^{e} éd. Française, 1979, 526 p.

(93).
Rosenquist (B. D.). Rhinoviruses : isolation from cattle with acute respiratory disease. Am. J. Vet. Res, 1971, 32 (5), 685-688.

(94).
Rossi (C. R.), Kiesel (G. K.). Bovine RSV infection of bovine embryonic lung cultures : a kinetic study by fluorescent antibody technique. Am. J. Vet. Res, 1977, 38(11), 1901-1904.

(95).
Ruckerbaner (G. M.), Giraud (A.), Bannister (G. L.), Boulanger (P. Studies on bovine virus diarrhea : serum neutralization, complement fixation and immunofluorescence.
Can. J. Comp. Med. 1971, 35, 230-238.

(96).
Sashi-B-Mohanty. Comparative study of bovine adenoviruses. Am. J. Vet. Res. 1971, 32 (12); 1899-1905.

(97).
Sattar (S. A.), Bohl (E. H.). Some studies of infectious bovine rhinotracheitis (IBR) virus infection in calves.
Can. J. Comp. Med. 1968, 32, 587-592.

(98).
Scott (F. W.), Shively (J. N.), Gaskin (J.), Gillespie (J. H.) Bovine syncytial virus isolations. Archiv für die gesamte virus forschung 1973, 43, 43-52.

(99).
Snodgrass (D. R.), Burrells (C.), Wells (B. W.). Isolation of reovirus type 2 from respiratory tract of sheep.
Archives of virology 1976, 52, 143-149.

(100).
Singh (K. V.). Intranuclear inclusions in bovine embryo cell cultures infected with bovine virus diarrhea-Mucosal disease virus. Vet. Rec. 1969, 84, 230-232.

(101).
Siourine (V. N.). Le diagnostic des maladies virales des veaux. Bull. off. inter. Epiz. 1976, 85 (1-2), p 3-10.

(102).
Skulmowska - Kryszkowska (D.), Baczynski (Z.), Majewska (M.) Differential diagnostics of mixed infections with pneumotropic and enterotropic bovine viruses. I. Attempts to preparate and apply a conjugate for parainfluenza 3 and infectious bovine rhinotracheitis viruses. Bull. Vet. Inst. Pulawy, 1974, 18 (3-4), 62-66.

(103).
Société Française de Buiatrie. Les maladies respiratoires des jeunes bovins. Problèmes actuels en France. Aspects diagnostic et prophylactique. Application au cas particulier de l'IBR/IPV. Journée d'information. Tours, 27 janvier 1977.

(104).
Solsona (M.), Perrin (B.), Perrin (M.), Moussa (A.) Recherche des anticorps contre le virus de la rhinotracheite bovine infectieuse par la méthode ELISA. Bull. Acad. Vet. de France, 1980, 53, 215-225.

(105).
Spence (D.), Kenny (G.), Mc Lure (A. R.), Mac Farlane (D. E.) Sommerville (R. G.). The preparation of an antiserum to adenovirus group. (Hexon) antigen, to be used for immunofluorescent detection of infection with different adenoviruses. Arch. Ges. Virusf. 1971, 34, 340-345.

(106).
Spradbrow (P. B.), Francis (J.). Electron microscopy as an aid to the rapid identification of animal viruses. Vet. Rec. 1969, 84, 244-246.

(107).
Straver (P. J.). Plaque formation by non-cytopathogenic bovine virus diarrhea strains. Arch. Ges Virusf. 1971, 34, 131-135.

(108).
Swanepoel (R.), Blackburn (N. K.), Wilson (A.). A comparison of methods for demonstrating antibodies to the virus of infectious bovine rhinotracheitis : infectious pustular vulvovaginitis. Br. Vet. J. 1976, 132, 423-427.

(109).
S. N. G. T. V. Les maladies respiratoires à virus des bovins Bull. des GTV, 1977, I. B. 089.

(110).
Taylor (W. P.), Momoh (M.), Okeke (A. N. C.), Gunde (A.). Antibodies to parainfluenza 3 virus in cattle, sheep and goats from northern Nigeria. Vet. Rec. 1975, 97, 183-184.

(111).
Terpstra (C.) Diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis by direct immunofluorescence. The veterinary Quarterly, 1979, 1 (3), 138-144.

(112).
Thomas (L. H.), Stott (E. J.), Jebbett(J.), Hamilton (S.) The Growth of respiratory syncytial virus in organ cultures of bovine foetal trachea. Archives of virology, 1976, 52, 251-258.

(113).
Vandaele (G.). Les broncho-pneumopathies infectieuses enzootiques des bovins. Thèse - Toulouse 1973 n° 94.

(114).
Van der Maaten (M. J.). Immunofluorescent studies of bovine parainfluenza 3 virus I. cell cultures and experimentally infected hamsters. Can. J. comp. Med. 1969, 33, 134-140.

(115).
Van der Maaten (M. J.). Immunofluorescent studies of bovine parainfluenza 3 virus. II. Experimentally infected calves. Can. J. Comp. Med. 1969, 33, 141-147.

(116).
Vargha (T.). Les viroses bovines causées par les virus respiratoires. Bull. GTV., 1977, I. B. 088.

(117).
Vargha (T.). Les viroses respiratoires. Le virus de la diarrhée à virus des bovins (BVD) dans les pneumopathies des jeunes veaux et les diarrhées néonatales.
9^{e} congrès international sur les maladies du batail Paris - 1976, Tome 1, 359-363.

(118).
Vargha (T.). Les virus respiratoires des bovins.
Synthèse, observations dans les élevages traditionnels.
Réflexions. Bull. Soc. Vet. pratique 1975, 459-486.

(119).
Vengris (V. E.), Maré (L. J.). A micro-passive hemagglutination test for the rapid detection of antibodies to infectious bovine rhinotracheitis virus. Can. J. Comp. Med., 1971, 35, 289-293.

(120).
Wellemans (G.), Leunen (J.). Le virus respiratoire syncytial et les troubles respiratoires des bovins. Annales de Med. Vet. 1975, (986) 359-369.

(121).
Wellemans (G.), Van Opdenbosch (E.), De Kegel (D.). La neutralisation de l'immunofluorescence indirecte (N. I. F. I.) : une technique spécifique et quantitative pour la mise en évidence d'antigènes viraux. Ann. Med. Vet. 1979, 123, 185-194.

(122).
Wellemans (G.) Laboratory diagnosis methods for bovine respiratory syncytial virus. Veterinary Science Communications, 1977, 1, 179-189.

(123).
Wellemans (G.). Les méthodes de diagnostic du virus respiratoire syncytial bovin. 9^{e} congrès internationnal des maladies du bétail. Paris 1976. Ed. scientifique E. Meissonnier. Tome 1 373-379.

(124).
Wellemans (G.), Leunen (J.). La rhinotrachéite infectieuse des bovins (I. B. R.) et sa sérologie. Ann. Med. Vet. 1973, 117, 507-518.

(125).
Wellemans (G.), Leunen (J.). Maladies à virus des bovins. Quelques réflexions après neuf années de recherches. Ann. Med. Vet. 1974, 118, 95-103.

(126).
Wellemans (G.), Leunen (J.). Le tropisme digestif du virus I. B. R. (II^{e} partie). Examens virologiques. Ann. Med. Vet. 1974, 118, 243-251.

(127).
Wellemans (G.), Diagnostic et prophylaxie de la rhinotrachéite infectieuse des bovins (I. B. R.).
Bull. G.T.V., 1974, juillet, 1-5.

(128).
Woods (G. J.). The natural history of bovine myxovirus para-influenza 3 J. A. V. M. A. 1968, 152 (6), 771-778.

IMP COREP
21 rue Viguerie - TOULOUSE
Tél. : (61) 42.01.56